



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Expresión Proteómica del Plasma Seminal del Toro Criollo
San Martinero y su Relación con la Fertilidad y
Desarrollo Embrionario *in Vitro* en Condiciones del
Trópico Bajo Colombiano

Dña. Diana Patricia Barajas Pardo
2013



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Expresión Proteómica del Plasma del Toro Criollo
San Martinero y su Relación con la Fertilidad y
Desarrollo Embrionario *in Vitro* en Condiciones del
Trópico Bajo Colombiano

Dña. Diana Patricia Barajas Pardo
2013

La presente Tesis Doctoral titulada "**EXPRESIÓN PROTEÓMICA DEL PLASMA SEMINAL DEL TORO CRIOLLO SAN MARTINERO Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD Y DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO EN CONDICIONES DEL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO**", ha sido realizada en los laboratorios de los Departamentos de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la universidad de Murcia en España, así como en los laboratorios del centro de reproducción integrada anima CRIA y Centro de Biotecnología y Bioindustria, CBB de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica en Colombia, por Dña. Diana Patricia Barajas Pardo, bajo la orientación de la Dra. Pilar Coy Fuster de la Universidad de Murcia en España, el Dr. José Guillermo Velásquez Penagos del CRIA de CORPOICA y el Dr. Jaime Antonio Cardozo Cerquera del CBB de Corpoica y la asesoría estadística del Dr Jorge Arguellez, y Hugo Ballesteros de del departamento de Biometria de Corpoica.

Murcia, Julio del 2013

Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos, AGL2012-40180-C03-01 Universidad de Murcia en España convenio Mineco y Feder, y el Centro de Reproducción CRIA, CI La Libertad de la Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria Corpoica en convenio con Ecopetrol 1754 y convenio con Colciencias 7106-07-14951

Parte de los resultados de este estudio de investigación modalidad tesis doctoral como requisito para optar el título de Doctor en Biología y Tecnología de la Reproducción en Bovinos, se han expuesto cuatro comunicaciones científicas que fueron seleccionadas en eventos Internacionales, tres en la modalidad presentación oral y una en la modalidad de poster.

- 1) **Barajas, D P.**, Coy, P., Cardozo, J., Velásquez, J.H., Velásquez, JG. “Proteínas de plasma seminal asociadas a la fertilidad del bovino criollo Sanmartinero en condiciones del trópico bajo Colombiano”. XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias PANVET 2012
- 2) **Barajas, D P.**, Coy, P., Cardozo, J., Velásquez, JG. “Proteínas del plasma seminal implicadas en la calidad espermática del bovino criollo Sanmartinero y Cebú Brahman”. Memorias I Encuentro internacional de investigadores. “Una visión multidisciplinaria del conocimiento”. Universidad Cooperativa de Colombia. Noviembre 7 y 8 del 2012.
- 3) **Barajas, D P.**, Coy, P., Velásquez, JG., Rueda, F., Herrera, R., Cardozo, J.A. “Proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad de toros criollos Sanmartinero y Cebú en condiciones del trópico Colombiano”. Memorias VII Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe SIRGELAC. 2009, p 153-154
- 4) **Barajas, D.P.**, Coy, P., Velásquez, JG., Rueda, F., Herrera, R., Cardozo, J. “Perfiles electroforéticos de las proteínas del plasma seminal del bovino criollo sanmartinero y cebú bajo condiciones climáticas del piedemonte llanero”. Memorias del III Congreso Internacional de Microbiología. Universidad de Pamplona. Septiembre del 2008

A mis padres, Hilda y Félix

A mi esposo, José Guillermo

A mis hijas, Dany y Sofy

AGRADECIMIENTOS

Al fin llegó el momento de intentar plasmar en unas pocas hojas tantos sentimientos y vivencias de estos últimos años, desde que inició la ilusión de cursar mis estudios de Doctorado. Vienen a mi mente tantos recuerdos de gratos momentos vividos, pero también de épocas difíciles con el trabajo de laboratorio.

Fueron muchas las personas que contribuyeron a lograr este objetivo, por eso deseo expresar mis agradecimientos

Ante todo.....

A Dios. *Por permitirme hacer una realidad la culminación de mis estudios, por la perseverancia que me dio para poder alcanzar esta meta que me ha permitido crecer personal y profesionalmente*

Por permitirnos a mi familia y a mí, haber tenido la experiencia de vivir en ese hermoso país, y haber conocido a tan maravillosas personas a lo largo de nuestra estadía, amigos que llevo en mi corazón con infinito cariño.

A mis padres. *Por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por sus sabios consejos, sus enseñanzas, su formación en valores y por animarme a no desfallecer ante las dificultades.*

A mis hermanos. *A Lyda por su compañía y apoyo en la distancia, por los momentos compartidos en esos calurosos agostos de vacaciones. A Edwin y Yesid por estar siempre pendientes de nosotros, de cualquier necesidad que tuviésemos cuando vivimos en España.*

A Pilar Coy. *Por darme la oportunidad de iniciar mis estudios de doctorado, por sus enseñanzas, su constante apoyo científico y confianza en el desarrollo de mi trabajo de tesis, por el orgullo de tener como directora a una excelente persona y gran investigadora. Pero muy especialmente por preocuparse por mi familia y por mí, siempre pendiente de nuestro bienestar y haciéndonos sentir como en casa cuando llegamos a un país, que aunque hermano, era para nosotros novedoso y diferente. Por su linda familia: Rafa, María, Pilar y Rafita.*

A Carmen, Rakel, Salva, Joaquín y su familia, *por todas sus enseñanzas y consejos para mejorar el trabajo en el laboratorio, por los gratos momentos compartidos al tomar el cafecito de la mañana, en las pausas de trabajo.*

A mis compañeros de estudio:

Fran y David, mis compañeros de despacho, por lo gratos momentos compartidos, por sus enseñanzas no solo en el laboratorio, si no de la vida en España, por hacer más fácil ese intercambio cultural, donde hablando el mismo idioma, no siempre era fácil entendernos.

Empar por sus enseñanzas en ICSI, ***Sebastián*** por sus consejos para mejorar la FIV, ***Manolo*** por su buen humor.

A ***los Juanes*** por su ayuda en el laboratorio.

A ***Ángel Poto***, por sus enseñanzas en el SERIDA, por su amabilidad con mi familia, por las vacaciones en su casa de la playa de Puerto-Mazarrón. A ***Begoña***, por sus enseñanzas en el laboratorio.

A ***Virginia***, nuestra amiga incondicional en Madrid, quien estuvo siempre pendiente de nuestro bienestar.

A ***Jaime Cardozo***, director de tesis, por su constante apoyo científico en muchas horas de trabajo, siempre con la mejor disposición, por sus enseñanzas del mundo de la proteómica, por su calidad humana y por brindarme ánimo ante los tropiezos iniciales con los geles.

A ***Roci***, por su apoyo en las largas jornadas en el laboratorio de proteómica, buscando alternativas para solucionar los iniciales intentos fallidos de poner a punto los protocolos de electroforesis y lograr al fin los mapas electroforéticos, a ***Fabián*** por su colaboración y a los demás compañeros del laboratorio y del centro de investigaciones Tibaitatá, con quienes compartí mi tiempo de estancia.

A ***Eliana***, por las noches que pasamos trabajando FIV en el laboratorio, siempre buscando los mejores resultados. A ***Gustavo***, por su amable e incondicional colaboración con la toma de las muestras seminales para desarrollar mi trabajo y por estar atento a cualquier necesidad que tuviésemos en el laboratorio. A ***Manuel*** por el transporte de ovarios desde el frigorífico, y a los demás compañeros del CRIA en el centro de investigaciones la Libertad.

A los ***Dres. Jorge Arguelles y Hugo Ballesteros***, por su apoyo en el análisis estadístico.

Al ***Dr., Jaime Triana*** - qepd, por apoyar la realización esta tesis en Corpoica. Lamento que no esté con nosotros en este momento, para ver al fin culminado este trabajo por el que me insistía constantemente.

Al ***Dr., Rubén Valencia***, por continuar con el apoyo para la culminación del trabajo de tesis.

A la Dra. ***Beatriz Abadía***, Dres. ***Fernando Rodríguez*** y ***Henry Velásquez*** del CBB-Tibaitatá y CRIA-La Libertad.

*A mis compañeros de trabajo de la Universidad Cooperativa de Colombia: al Dr. **Darío**, siempre entusiasta y colaborador, a **Glorita, Camilo, Néstor** y demás colegas, con quienes comparto la mayor parte de mis días, por esos momentos anti stress, por entender mis afanes constantes, tratando de cumplir de la mejor manera con mis responsabilidades como docente, estudiante y madre. Al **Dr. César Pérez**, y demás directivas de la Universidad por su apoyo con el tiempo de estudio, en la finalización de las correcciones de la tesis.*

*A **Ecopetrol** y el **Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural** por la financiación de este trabajo. A **Friogán**, por facilitarme los ovarios para el desarrollo de este trabajo.*

Y a las personas más importantes en mi vida...

*Gracias a mis hijas **Dany y Sofy**, por toda la paciencia que han tenido con el tiempo prestado para desarrollar mis estudios, por las noches de espera, por los fines de semana destinados a trabajar, por los tiempos de espera en los laboratorios, por entender que a pesar de tanto trabajo, siempre serán la bendición y orgullo más grande de mi vida, por entender que hay que trabajar duro para alcanzar las metas.*

Espero, al fin..... ahora..... podamos recuperar con creces todo ese tiempo.

*A **Guille**, mi Esposo y Director de tesis, el motor de mi vida y de este trabajo, sin tu apoyo de inicio a fin, sin tu persistencia, habría sido difícil culminar este trabajo. Gracias por tus conocimientos, por aportar tu experiencia en investigación, por tus aporte científicos, por tus ideas innovadoras, por las largas noches de discusión sobre la orientación de este trabajo, animándome cuando las cosas no salían como esperaba, por enseñarme a ser paciente y constante, por siempre buscar recursos y alternativas para sacar adelante este proyecto, por no permitirme dar un paso atrás, pero sobre por siempre estar siempre ahí, a mi lado. ¡Este triunfo es tuyo!*

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aSFP: Proteína ácida del fluido seminal

BIC: Criterio de interrelación bayesiano

BSP: Plasma seminal bovino

CCOs: Complejo cúmulos ovcitos

FIV: Fecundación *in vitro*

MIV: Maduración *in vitro*

Mr: Masa relativa

OPN: Osteopontina

pI: Punto isoeléctrico

PLA-2: Fosfolipasa A₂

PM: Peso molecular

RA: Reacción acrosómica

SM: San Martinero

C: Cebú

SEM: Error estándar de la media

SOF: Fluido oviductal Sintético

ÍNDICE

INDICE

Página

I.RESUMEN.....	1
II. SUMMARY	13
III.INTRODUCCIÓN	19
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
IV.4.1 Ovocito mamífero	27
IV.4.2. Semen de mamíferos.....	30
IV.4.2.1. Espermatozoide mamífero	31
IV.4.2.2. Plasma seminal.....	34
IV.4.2.3. Eyaculación.....	36
IV.4.2.4. Calidad espermática.....	36
IV.4.2.4.1. Motilidad	37
IV.4.2.4.2. Concentración.....	38
IV.4.2.4.3. Morfología.....	38
IV.4.2.4.4. Viabilidad espermática	39
IV.4.2.4.5. Integridad o estado del acrosoma.	39
IV.4.2.4.6. Efectos de la variación climática sobre la calidad espermática	39
IV.4.3. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO.....	41
IV.4.3.1. Transporte y almacenamiento de gametos a través del oviducto	41
IV.4.3.2. Capacitación	44
IV.4.3.3. Hiperactivación de la motilidad espermática	46
IV.4.3.4. Reacción acrosómica	47
IV.4.3.5. Unión y reconocimiento de gametos.....	48
IV.4.3.6. Penetración espermática y fecundación	49

IV.4.3.7. Reacción cortical y bloqueo de la polispermia	51
IV.4.4. PRODUCCIÓN <i>in vitro</i> DE EMBRIONES	54
IV.4.4.1. Obtención y selección de ovocitos.....	55
IV.4.4.2. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	56
IV.4.4.3. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV)	60
IV.4.4.4. Cultivo y desarrollo embrionario <i>in vitro</i>	62
IV.5.1. PROTEÓMICA DEL PLASMA SEMINAL	68
IV.5.1.1. Proteínas BSP.....	70
IV.5.1.1.1. Propiedades bioquímicas de las BSP	70
IV.5.1.1.2. Rol biológico de las BSP.....	72
IV.5.1.2. Espermadhesinas.....	79
IV.5.1.3. Fosfolipasa A ₂ (PLA-2)	81
IV.5.1.4. Plasmina seminal (SPLN).....	81
IV.5.1.5. Proteínas del shock calórico (HSP)	81
IV.5.1.6. Osteopontina (OPN).....	83
IV.5.1.7. Clusterina.....	85
IV.5.1.8. Proteína Prostaglandina D- sintetasa tipo Lipocalina (PDGS) (SP26).	86
IV.5.1.9. Caltrina (Calcium transport inhibitor)	87
IV.5.2. Predicción de la fertilidad del toro basada en la proteómica.....	87
IV.5.2.1. Proteínas asociadas a la alta y baja fertilidad	88
IV.5.2.2. Proteínas relacionadas con la Reacción Acrosómica e interacción espermatozoide-ovocito.....	93
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
V.3.1. Reactivos y Medios empleados para electroforesis.....	97
V.3.2. Reactivos y Medios para procesos <i>in vitro</i> de producción de embriones bovinos .	98

V.3.3. Reactivos y Medios para congelación del semen.....	105
V.4.1. Obtención de muestras seminales	106
V.4.2. Obtención de plasma seminal para identificación de proteínas	106
V.4.3. Obtención de ovarios	106
V.4.4. Obtención de ovocitos inmaduros	107
V.4.4.1. Selección de complejos <i>cumulus</i> -ovocitos (CCOs).....	107
V.5.1. Evaluación Macroscópica	108
V.5.2. Evaluación Microscópica:.....	109
V.5.2.1. Concentración espermática.....	109
V.5.2.2. Motilidad.....	109
V.5.2.3. Viabilidad espermática.	110
V.5.2.4. Morfología	111
V.5.2.5. Índice de calidad espermática (ICE)	112
V.7.1. PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL	114
V.7.1.1. Determinación de la concentración de proteína de la muestra y cantidad de proteína a cargar.	115
V.7.1.2. Elaboración de geles.....	115
V.7.1.3. Procedimiento de Electroforesis Unidimensional.....	115
V.7.1.4. Tinción del gel captura y análisis de imágenes.....	116
V.7.2.2. Determinación de la cantidad de muestra a cargar.....	117
V.7.2.3. Procedimiento electroforesis bidimensional.....	117
V.7.2.3.1. Rehidratación de tiras (IPGs).....	117
V.7.2.3.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	117
V.7.2.3.3. Equilibrio de las tiras (IPGs).....	118

V.7.2.3.4. Segunda dimensión: Electroforesis en SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)	118
V.7.2.3.5. Elaboración de geles de poliacrilamida	118
V.7.2.3.6. Procedimiento Segunda dimensión: SDS-PAGE	119
V.7.2.3.7. Tinción del gel, captura y análisis de imágenes	119
V.8.1. Maduración <i>in vitro</i> (MIV) de ovocitos	119
V.8.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) de ovocitos	120
V.8.2.1. Preparación de los espermatozoides: Capacitación espermática	120
V.8.2.2. Preparación y fecundación de ovocitos	120
V.8.2.3. Cultivo embrionario	121
V.8.2.4. Valoración microscópica de resultados	121
VI. RESULTADOS	125
VI.2.1. Estudios unidimensionales (SDS-PAGE)	127
VI.2.1.1. Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero	127
VI.2.1.2. Proteínas del plasma seminal del ganado Cebú	130
VI.2.1.3. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática entre los ganados San Martinero y Cebú.	131
VI.2.1.4. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática en ganado San Martinero en la época seca y lluviosa	132
VI.2.2. ESTUDIO DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL POR ELECTROFORESIS 2D SDS – PAGE	135
VI.2.2.1. Evaluación comparativa entre la época lluviosa y la época seca de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática en ganado criollo San Martinero.	136
VI.2.2.2. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática de los perfiles electroforéticos 2D del plasma seminal del ganado criollo San Martinero con Cebú Brahman.	141
VI.3.1. ESTUDIOS POR ÉPOCA	144

VI.3.1.1. Comportamiento de las variables de calidad espermática en fresco, asociadas a grupos de proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa	145
VI. 3.1.1.1. Volumen seminal	147
VI. 3.1.1.2. Concentración espermática X10 ⁶	150
VI. 3.1.1.3. Motilidad espermática	154
VI. 3.1.1.4. Viabilidad espermática	156
VI. 3.1.1.5. Morfología espermática.....	159
VI. 3.1.1.6. Índice de calidad espermática (ICE).....	161
VI. 3.1.1.7. Producción de espermatozoides congelables (Número de pajillas congeladas)	163
VI.3.1.2. Comportamiento de las variables de calidad espermática post-descongelación y su relación con las proteínas del plasma seminal de toros San Martinero en época seca y lluviosa.....	168
VI.3.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación.....	168
VI.3.1.2.2. Viabilidad espermática post-descongelación.....	170
VI.3.1.2.3. Morfología espermática post- descongelación	173
VI.3.1.2.4. Índice de calidad espermática post-descongelación	176
VI.3.1.3. Relación entre los resultados fertilidad <i>in vitro</i> y las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa.....	179
VI.3.1.3.1. Porcentaje de fertilidad <i>in vitro</i> (2PN).....	179
VI.3.1.4. Relación entre el porcentaje de blastocistos producidos <i>in vitro</i> y las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa.....	183
VI.3.1.4.1. Blastocistos.....	183
VI.3.1.5. Comportamiento de la concentración de puntos de proteínas del plasma seminal en la época lluviosa y seca.....	185
VI.3.2. Estudios por raza	189

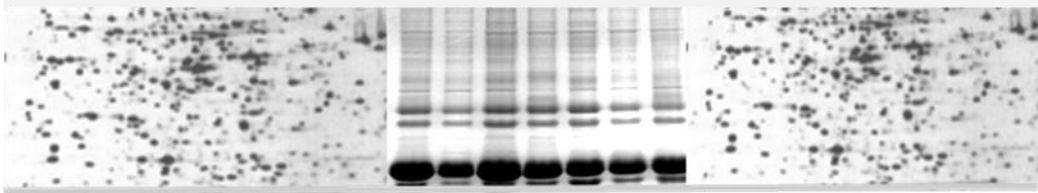
VI. 3.2.1. Comportamiento de las variables de calidad espermática en fresco, asociadas a grupos de proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero comparado con la raza cebú	191
VI.3.2.1.1.Volumen seminal.	192
VI.3.2.1.2.Concentración espermática	196
VI.3.2.1.3. Motilidad espermática	201
VI.3.2.1.4. Viabilidad espermática.....	204
VI.3.2.1.5. Morfología espermática	207
VI.3.2.1.6. Índice de calidad espermática.....	209
VI.3.2.1.7. Producción de espermatozoides congelables (Número de pajillas congeladas)	212
VI.3.2.2. Comportamiento de las variables de calidad espermática de semen post-descongelado asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero comparadas con el Cebú.....	215
VI.3.2.2.1. Motilidad post-descongelación	216
VI. 3.2.2.2 Viabilidad post descongelación	218
VI. 3.2.2.3. Morfología post-descongelación	221
VI. 3.2.2.4. Índice de calidad espermática post-descongelación.	224
VI. 3.2.3. Comportamiento de las variables del proceso de fecundación asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero y Cebú brahman	226
VI. 3.2.3.1. Porcentaje de fertilidad (2PN)	226
VI. 3.2.4. Comportamiento de las variables de la producción de blastocistos asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero y Cebú Brahman.....	228
VI.3.3. Promedios de variables de calidad de espermatozoides pre y post-congelados y resultados de fertilidad <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en los toros San Martinero	233
VI.3.3.1. Valores de mayor y menor promedio para las variables de calidad espermática del semen fresco de los toros San Martinero.....	233

VI.3.3.2. Valores de las variables de mayor y menor promedio para calidad espermática post-descongelación en los toros San Martinero.	234
VI.3.3.3. Valores de las variables de mayor y menor promedio de fertilidad y desarrollo embrionario <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	234
VII.DISCUSIÓN	240
VII.1.1. Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero comparadas con el Cebú Brahman vistas desde el análisis de lectura electroforética en una dimensión.....	240
VII.1.2 Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época lluviosa comparadas con la época seca, vista desde el análisis de lectura electroforética en una dimensión.	242
VII.2.1. Panorama General y comportamiento puntual de los puntos de proteína	243
VII.2.2. Evaluación comparativa de las proteínas del plasma seminal detectadas en ganado criollo San Martinero en la época lluviosa y en la época seca. Panorama general.	244
VII.2.3. Evaluación comparativa del toro criollo San Martinero con la raza Cebú Brahman, panorama general.....	246
VII.2.4. Calidad espermática y su relación con cluster de proteínas del plasma seminal.	250
VII.2.4.1. Volumen seminal.....	250
ÉPOCA.....	250
RAZA.....	251
VII.2.4.2. Concentración espermática.....	253
ÉPOCA.....	253
RAZA.....	255
VII.2.4.3. Motilidad.....	256
ÉPOCA.....	256
RAZA.....	256
VII.2.4.4. Viabilidad espermática	257

ÉPOCA.....	257
RAZA.....	257
VII.2.4.5. Morfología espermática.....	258
ÉPOCA.....	258
RAZA.....	259
VII.2.4.6. Índice de calidad espermática.....	259
ÉPOCA.....	259
RAZA.....	260
VII.2.4.7. Producción de espermatozoides congelables (número de pajillas congeladas)	260
ÉPOCA.....	260
RAZA.....	261
VII.2.5. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN POST-DESCONGELADO ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO EN ÉPOCA SECA Y LLUVIOSA Y POR EFECTO DE LA RAZA AL COMPARARLA CON EL CEBÚ.....	262
VII.2.5.1. Motilidad espermática post-descongelación.....	262
ÉPOCA.....	262
RAZA.....	262
VII.2.5.2. Viabilidad espermática post-descongelación.....	263
ÉPOCA.....	263
RAZA.....	264
VII.2.5.3. Morfología espermática post-descongelación.....	264
ÉPOCA.....	264
RAZA.....	265
VII.2.5.4. Índice de calidad espermática post-descongelación.....	265

ÉPOCA.....	265
RAZA.....	266
VII.2.6. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO DE FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO EN ÉPOCAS LLUVIOSA Y SECA COMPARADO CON CEBÚ BRAHMAN.....	267
VII.2.6.1. Porcentaje de fertilidad (2PN).....	267
ÉPOCA.....	267
RAZA.....	268
VII.2.6.2. Blastocistos.....	268
ÉPOCA.....	268
RAZA.....	269
VII.2.7. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PUNTOS DE PROTEÍNAS SELECCIONADAS DEL PLASMA SEMINAL EN LA EPOCA LLUVIOSA, SECA Y POR RAZA.....	269
ÉPOCA.....	269
RAZA.....	269
VII.2.8. ASOCIACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL.....	270
VII.2.9. COMPORTAMIENTO DE VARIABLES DE CALIDAD DE ESPERMATOZOIDES PRE Y POST-CONGELADO Y DE PROTEÍNAS DE TOROS DE MAYOR Y MENOR PROMEDIO ASOCIADAS A LA FERTILIDAD <i>IN VIVO</i>	270
AVANCE, RECOMENDACIONES Y ESPECTATIVAS FUTURAS.....	271
VII. CONCLUSIONES.....	274
VIII. CONCLUSIONS.....	275
IX. BIBLIOGRAFIA.....	275

I. RESUMEN



I.RESUMEN

La producción animal en un país tropical como Colombia se ve limitada, entre otras cosas, por factores ambientales adversos, como temperatura, humedad relativa y radiación solar altas a lo largo del año, acompañadas de una baja disponibilidad de biomasa forrajera de mala calidad y por la proliferación de plagas y enfermedades. En los sistemas de producción bovina Colombiana existen razas criollas como la San Martinero, con un buen grado de adaptación a las altas temperaturas características de nuestro medio tropical. Los toros de esta raza han demostrado a través del tiempo los mejores índices reproductivos (fertilidad, natalidad, intervalo entre partos) al compararlos con las demás razas que, a pesar de estar adaptadas, presentan un comportamiento inferior en los aspectos reproductivos. En los últimos años, diversos estudios en proteómica mediante procedimientos de electroforesis bidimensional 2D-PAGE han relacionado la mayor fertilidad de toros reproductores probados con la presencia o ausencia de ciertas proteínas del plasma seminal producidas por las glándulas sexuales accesorias, que se adhieren al espermatozoide afectando la función espermática. Estos estudios han permitido identificar el perfil de proteínas de toros de alta y baja fertilidad, de tal manera que algunas proteínas se pueden emplear como bio-marcadores de fertilidad (Killian *et al.*, 1993; Jobim *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2006; Rocoltta *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2007; Novak *et al.*, 2010; Sankhala *et al.*, 2010 2011; Stinshoff *et al.*, 2012).

La aparición o desaparición de puntos específicos de proteína indican diferencias en la expresión proteica, mientras que el grado de intensidad de los puntos provee información cuantitativa acerca de los niveles de expresión de la proteína (Kumar *et al.*, 2012; Davalieva *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta estos estudios y buscando el porqué de la mayor fertilidad de los toros San Martinero, este trabajo de investigación involucra las proteínas del plasma seminal y su asociación con la fertilidad *in vivo* y la producción de embriones *in vitro* de esta raza criolla en la época lluviosa comparada con la época seca y con la raza Cebú Brahman, la de mayor población en Colombia. Los datos aquí presentados corresponden a los primeros estudios a nivel nacional, con apoyo de Corpoica, Ecopetrol, Colciencias y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MARD) de Colombia.

Para el estudio se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el perfil electroforético de toros de las razas San Martinero y Cebú al inicio de la edad reproductiva, en condiciones del trópico bajo Colombiano.
- Definir diferencias o similitudes del perfil de proteínas del plasma seminal del toro San Martinero asociadas a los indicadores de calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario por efecto de la época lluviosa y seca.
- Establecer entre los toros de la raza San Martinero y Cebú Brahman asociaciones entre las proteínas del plasma seminal y los indicadores de calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario.

Resumen

-Relacionar proteínas del plasma seminal con el valor de fertilidad en toros San Martinero y compararlos con la raza Cebú Brahman.

Para la investigación se seleccionaron al azar 7 toros reproductores puros de la raza San Martinero (SM) del banco de Germoplasma de Corpoica y 7 toros Cebú Brahman (C) de un criadero reconocido de ganado puro, ambos en edad reproductiva. Los ejemplares se mantuvieron en situaciones similares bajo pastoreo en *Brachiaria decumbens* en los campos experimentales del Centro de Investigaciones la Libertad de Corpoica. El tiempo de evaluación por época se realizó en el ganado San Martinero tanto en el período de lluvias como de sequía y la evaluación entre razas (SM y Cebú) únicamente se realizó en la época lluviosa. Para cada toro, los muestreos seminales y análisis en fresco se realizaron tres veces. Del semen congelado de cada toro, en cada muestreo, se seleccionaron 5 pajillas al azar para su respectiva evaluación de calidad espermática, fecundación *in vitro* y producción de blastocistos. El análisis de la información se basó en Modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo. Para evaluar el efecto de la época (Lluvia y Seca) y la raza (SM y Cebú) sobre las variables de calidad espermática se utilizó el procedimiento MIXED (Modelo mixto) con medidas repetidas en el tiempo con el paquete estadístico SAS® (versión 9.0), utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X3 para calidad del semen en fresco y 2x5 para calidad del semen post-descongelación.

Los resultados del estudio permitieron evidenciar mediante la electroforesis unidimensional de las proteínas del plasma seminal la presencia de 13 bandas de proteína en San Martinero y 12 en Cebú Brahman, durante la época lluviosa. Diez de estas bandas se encontraron en ambas razas, dos se presentaron solo en San Martinero y una exclusivamente en el Cebú. En el plasma seminal del San Martinero se detectaron 16 bandas en la época de sequía, tres más que en la época lluviosa.

La señal de proteína en los geles de poliacrilamida registrados en el mapa referencial bidimensional SDS-PAGE de los toros San Martinero estudiados para las dos épocas muestra 64 puntos (98,46%) para la época lluviosa, de los 65 puntos detectados en las dos épocas, y 52 puntos (80%) para la época seca de los cuales 51 puntos (78.46%) están presentes en las dos épocas. 13 puntos de proteína (20%) se encuentran únicamente en la época lluviosa y 1 punto (1.85%) en la época seca. Para estas proteínas, los pesos moleculares registrados en el mapa de referencia oscilaron entre 13.8 y 66.65 kDa y los puntos isoeléctricos (pIs) se enmarcaron entre 3.59 y 9.8, de los cuales el 95% se localizó por debajo de la neutralidad ($pI < 7$) representando proteínas ácidas o ligeramente ácidas; un 1.5% representó una proteína neutra de peso molecular 17.50 kDa y se identificaron también dos proteínas con $pI > 7$, alcalinas o ligeramente alcalinas, con pesos moleculares de 16.69 y 16.72 kDa y puntos isoeléctricos de 8.63 y 9.8.

Resumen

Los puntos de proteínas detectados en la raza Cebú Brahman en el mapa electroforético se enmarcan en 37 registros, 27 menos que el San Martinero, con pesos moleculares entre 13.9 y 66.2 kDa, y pls entre 4.0 y 9.8. El 94,4% de los puntos de proteínas tienen pl por debajo de 7, similar al San Martinero (94.59%), lo que indica que la gran mayoría de puntos de proteína tienen un pH ácido, o ligeramente ácido. El 5.41% está representado por un punto de proteína con pl neutro, al igual que en el San Martinero, y una con pl alcalino, uno menos que en el San Martinero. De los 37 puntos de proteína presentes en la Raza Cebú Brahman, 35 (94.5%) se encuentran presentes en las dos razas, San Martinero y Cebú, dos puntos (5.41%) se encuentran únicamente en Cebú Brahman y 29 puntos son exclusivos de SM.

Los resultados obtenidos por efecto de la época lluviosa o seca sobre la calidad espermática en semen fresco del toro San Martinero indican, en términos generales, un comportamiento similar de los promedios de las variables concentración, motilidad, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática (ICE, $p > 0.05$). Sin embargo, para los promedios de la variable volumen seminal (9.36 ± 1.97 vs. 6.12 ± 2.49) y número de espermatozoides congelables expresados en pajillas de 30×10^6 espermatozoides (166.06 ± 35.54 vs. 101.1 ± 57.60) se observó un efecto negativo de la época seca en forma significativa ($p < 0.05$). La respuesta observada en el semen descongelado a diferencia del fresco señala cambios por efecto de la época para viabilidad ($p < 0.001$) y para motilidad, morfología e ICE ($p < 0.05$). Cuando comparamos el semen fresco del SM en época lluviosa con el Cebú Brahman en la misma época, la respuesta obtenida señala cambios a favor del SM de forma altamente significativa ($p < 0.001$) para concentración espermática, índice de calidad espermática y espermatozoides congelables y de forma significativa ($p < 0.05$) para volumen seminal. Los resultados de calidad espermática post-descongelado indican cambios a favor del SM de forma altamente significativa para viabilidad ($p < 0.001$) y de forma significativa ($p < 0.01$) para motilidad e índice de calidad espermática.

La relación de las proteínas con el comportamiento de las variables de calidad espermática en semen fresco por efecto de la época (lluviosa y seca) en la raza SM se identifica, con diferencias significativas, mediante las proteínas A4113 y A 2301, por acción conjunta, como posibles proteínas que contribuyen en la explicación de los cambios del volumen espermático; A5006, A7304, A2001 y A2301 para los cambios en la concentración espermática; A2001, A7304, A6307 para los cambios relacionados con motilidad; A2301 y A1407 con viabilidad; A4113, A4119, A2001, A6307 con índice de calidad espermática y A1407, A6307, A2001, A5101 y A7304 con producción de espermatozoides congelables. De igual forma, en el análisis de calidad del semen post-descongelado (PDC) se identifica la participación de los puntos de proteínas A507 con motilidad y viabilidad PDC; A4119 y A1407 con morfología PDC; A7304, A4113 y A1407 con índice de calidad espermática PDC; A3218, A4113, A4106, A5101, A6307, A3011 y A7304 con fertilidad *in vitro* y A2001 con producción de blastocistos.

Resumen

El concurso de las proteínas sobre el comportamiento de las variables de calidad espermática en semen fresco por efecto de la raza (San Marino y Cebú Brahman) reconoce, con diferencias significativas cuando se hacen este tipo de comparaciones, a las proteínas A3218, A4704, A2301, A4119 y A4113 como posibles proteínas que intervienen en la explicación de los cambios de volumen seminal; A6310, A4113 y A5101 con concentración espermática; A409, A1407, A4119 y A5101 con motilidad espermática; A6310, A2301, A4113, A3218, A2001 y A4119 con viabilidad espermática; A4119 y A4113 con morfología espermática; A4704, A3218, A2001, A2301 y A4113 con ICE, y A4704, A6310 y A4113 con producción de espermatozoides congelables. En este mismo sentido, el análisis de calidad del semen post-descongelado evaluado entre razas identifica la participación de las proteínas A1407, A6310, A2301, A4119 y A4113 con motilidad espermática PDC; A4119 y A4113 con viabilidad PDC; A4704 con morfología PDC; A4704, A4119, A4113 y A6310 con índice de calidad espermática PDC; A2001, A4704 y A409 con fertilidad *in vitro* y A4704, A409 y A2001 con producción de blastocistos.

Los resultados en cuanto a la concentración de proteínas del plasma seminal indican que existen diferencias ($p < 0.05$) para los puntos A7304, A2301 y A3011 en función de la época y para los puntos A4113, A4119, A2301 ($p < 0.001$) en función de la raza.

La participación de proteínas del plasma seminal en las comparaciones entre los toros de mejor y peor comportamiento reproductivo seleccionados de la raza SM por las variables de calidad espermática en fresco, post descongelado, fecundación y producción de blastocistos, evidencian en términos generales que no se define en forma concreta proteínas que expliquen específicamente la diferencia entre los toros San Martinero, ya que no existe el orden lógico esperado (mejor y peor comportamiento). Es posible que este resultado sea debido a la poca variación de eficiencia reproductiva de los sementales seleccionados para el estudio en esta raza.

Por otra parte, cuando el análisis se realiza entre los dos mejores toros de la raza SM y los dos de peor comportamiento de la raza Cebú, se observa un orden lógico esperado para el punto de proteína A2301 con cambios significativos ($p < 0.05$) y que está asociado con los toros de mayor promedio de las variables de eficiencia reproductiva. Dicho punto estaría definido como una posible BSP-A1 identificada en toros con buena fertilidad (Moura *et al.*, 2007). Por otra parte, se observan los puntos de proteína A4113 y el punto de proteína A4119 asociados a los toros de menor promedio de las variables que estiman la eficiencia reproductiva.

Los resultados anteriores se obtienen de la comparación de niveles de fertilidad (de mayor y menor promedio) obtenidos a nivel general entre las dos razas. Esto no quiere decir que estas proteínas sean o no sean las que identifiquen verdadera fertilidad a nivel general, sino que son respuestas que hay que visualizarlas dentro de la raza; es así que en el caso del punto de proteína A4119, es la proteína que más se expresa a nivel general en Cebú mientras que en

Resumen

SM, con sus concentraciones bajas, está muy asociada en forma directa con viabilidad espermática

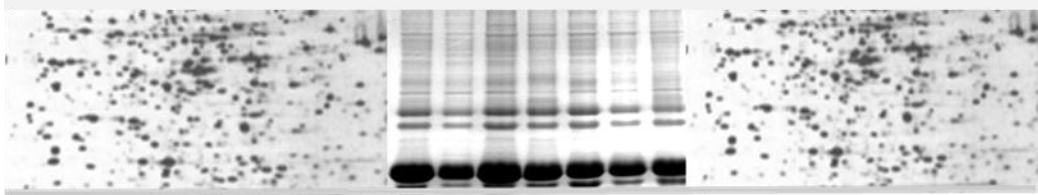
En resumen, como aportaciones principales de este trabajo, podemos indicar que la investigación realizada permitió generar los primeros mapas referenciales uni y bidimensionales de proteínas del plasma seminal de la raza San Martinero y la Cebú Brahman bajo las condiciones climáticas del trópico bajo Colombiano.

La eficiencia reproductiva de los toros San Martinero para la época de lluvias en términos de indicadores de calidad espermática, fecundación *in vitro* y efecto en el desarrollo embrionario vistos en forma integrada permite predecir la fertilidad *in vivo*. Los valores de estos indicadores no generaron grandes cambios por efecto de la época (seca o lluviosa), pero sí superan a los indicadores de eficiencia reproductiva de toros reproductores de la raza Cebú Brahman, resultados que permiten inferir que esta raza, procedente de España, se encuentra adaptada a las condiciones del trópico bajo Colombiano.

Los cambios de las variables estudiadas que determinan la calidad espermática de los toros por efecto de las proteínas plasmáticas son respuesta de su participación en forma de clúster que integra, bajo un modelo de predicción, proteínas con y sin cambios significativos y no en forma independiente. En este estudio reconocimos algunos modelos cuya asociación explica en gran parte el comportamiento de las variables de calidad seminal (volumen seminal, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermáticas), del ICE y producción de espermatozoides, en función de la raza, la época climática, o de acuerdo a si se trata de semen fresco o congelado-descongelado.

Finalmente, la investigación realizada permitió identificar que la proteína A2301 se asocia con los toros seleccionados como de mayor fertilidad, mientras que la A4113 y A4119 de pesos moleculares 15,37 y 15,49 kDa y pI de 5,38 y 5,15, respectivamente, se relacionaron con los toros de baja fertilidad.

II. SUMMARY



SUMMARY

Animal production in a tropical country like Colombia is limited, among others, by adverse environmental factors such as temperature, relative humidity and high solar radiation throughout the year, accompanied by a low availability of poor quality forage biomass and the proliferation of pests and diseases. In cattle production systems Colombian landraces exist, as San Martinero, with a good degree of adaptation to high temperatures, characteristic of our tropical environment. The bulls of this breed have proven over time the best reproductive rates (fertility, birth, calving interval) when compared to the other races, which despite being adapted, have underperformed in the reproductive aspects. In recent years various studies in proteomics by two-dimensional electrophoresis procedures 2D-PAGE, have linked fertility, tested in breeding bulls, with the presence or absence of certain proteins in the seminal plasma produced by the accessory sex glands, which adhere to sperm affecting sperm function and fertilization. These procedures have allowed the identification of bull protein profiles with high and low fertility, so that some proteins can be used as bio-markers of fertility (Killian *et al.*, 1993; Jobim *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2006; Rocoltta *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006; Moura *et al.*, 2007; Novak *et al.*, 2010; Sankhala *et al.*, 2010, 2011; Stinshoff *et al.*, 2012).

The appearance or disappearance of specific points of protein indicates differences in protein expression, while the intensity of dots provides quantitative information about the levels of protein expression (Kumar *et al.*, 2012; Davalieva *et al.*, 2012).

Given these studies and looking for the reason for the increased fertility of bulls San Martinero, this research involves seminal plasma proteins and their association with fertility *in vivo* and *in vitro* embryonic development of this Criollo breed at the rainy season compared to the dry season, and with the Zebu Brahman race that is the one with the highest population in Colombia. The present data are the first ones at the national level, supported by Corpoica, Ecopetrol, Colciencias and the Ministry of Agriculture and Rural Development (MARD) of Colombia.

The study had the following specific objectives:

To determine the electrophoretic profile of bulls San Martinero and Zebu races at the beginning of reproductive age in low Colombian tropical conditions.

To define differences or similarities in the seminal plasma proteins profile of the bull San Martinero associated with indicators of spermatic quality, fertility and embryonic development due to the rainy and dry seasons.

Summary

To set, among the bulls of San Martinero race and Zebu Brahman race, associations between seminal plasma proteins and sperm quality indicators, fertility and embryonic development.

To link seminal plasma proteins with the value of fertility in San Martinero bulls and to compare them with Zebu Brahman race.

For the investigation, seven pure breeding bulls San Martinero race (SM) from the Germplasm Bank of Corpoica and 7 Brahman Zebu bulls (C) of a pure breeding recognized cattle were randomly selected, both in a reproductive age. The bulls were kept in similar situations grazing on *Brachiaria decumbens* in the experimental fields of the Research Center "La Libertad" of Corpoica. The evaluation time for season was held at the San Martinero during the rainy season and drought season, and the evaluation between races (SM and Zebu) only took place in the rainy season. For each bull, seminal sampling and analysis were performed three times with fresh semen. From frozen samples of each bull, in each sampling, 5 straws were randomly selected for respective evaluation of sperm quality, *in vitro* fertilization and blastocyst production. The data analysis was based on mixed models with repeated measures over time. To evaluate the effect of the time (Rain and Dry) and race (SM and Zebu) on sperm quality variables, MIXED procedure was used (mixed model) with repeated measures in time with the SAS ® statistical package (version 9.0) using a completely randomized design with factorial 2X3 for fresh semen quality and 2x5 for post-thaw semen quality.

The study results allowed us to show, by dimensional electrophoresis of seminal plasma proteins, the presence of 13 protein bands in San Martinero and 12 in Zebu Brahman, during the rainy season. Ten of these bands were found in both races, two were found in San Martinero only and one band was exclusively found in Zebu. In the seminal plasma of San Martinero 16 bands were detected in the dry season, three more than in the rainy season.

The signal of protein in polyacrylamide gels recorded in the reference map dimensional SDS-PAGE from the San Martinero bulls studied for two seasons, showed 64 points (98.46%) for the rainy season, out of the 65 points identified in the two periods, and 52 points (80%) for the dry season of which 51 points (78.46%) are present in both seasons, 13 protein spots (20%) are found only in the rainy season and 1 point (1.85%) in the dry season. For these proteins, the molecular weights recorded in the reference map ranged between 13.8 and 66.65 kDa and isoelectric points (pI) were framed between 3.59 and 9.8, of which 95% are located below the neutral (pI <7) representing acidic or slightly acidic proteins. 1.5% represents a neutral protein of molecular weight 17.50 kDa and two proteins with pI > 7, alkaline or slightly alkaline, with molecular weights of 16.69 and 16.72 kDa and isoelectric points of 8.63 and 9.8, were also identified.

Summary

Protein spots detected in Brahman Zebu Electrophoretic Map are part of 37 records, 27 less than the San Martinero with molecular weights between 13.9 and 66.2 kDa, and pI between 4.0 and 9.8. The 94.4% of the protein spots had pI below 7, similar to San Martinero (94.59%), indicating that the vast majority of protein spots have an acidic pH or slightly acidic. The 5.41% is represented by a protein point with pI neutral, like in

San Martinero, and one alkaline protein, one less than in the San Martinero. Of the 37 protein spots present in Zebu Brahman Breed, 35 (94.5%) are present in the two races, San Martinero and Zebu, whereas two points (5.41%) are found only in Zebu and 29 points are exclusively found in SM.

The results obtained by effect of rainy or dry season on sperm quality of fresh bull semen San Martinero (SM) indicate, overall, a similar behavior for the variables concentration, motility, viability, morphology and sperm quality index (SQI, $p > 0.05$). However, for the variable semen volume (9.36 ± 1.97 vs. 6.12 ± 2.49) and number of freezable sperm, expressed in straws of 30×10^6 spermatozoa (166.06 ± 35.54 vs. 101.1 ± 57.60) a negative effect of the dry season was significantly showed ($p < 0.05$). The response observed in thawed spermatozoa, unlike the fresh semen, showed changes due to the time for viability ($p < 0.001$) and for morphology, motility and SQI ($p < 0.05$). When SM fresh semen is compared with Brahman Zebu at the same rainy season, the response shows highly significant changes in favor of SM ($p < 0.001$) for sperm concentration, SQI and freezable sperm, and significant ($p < 0.05$) for seminal volume. The results of post-thawing sperm quality indicate changes in favor of SM in a highly significant manner ($p < 0.001$) for viability and in a significant manner ($p < 0.01$) for motility and SQI.

The involvement of proteins on the behavior of variables of fresh semen sperm quality due to the season (wet and dry) in the SM race, was identified by the spots A4113 and A 2301, for joint action, as possible proteins that contribute in explaining changes in sperm volume; A1407, A5006, A7304, A2001 and A2301 as spots related with sperm concentration; A2001, A7304 and A6307 with motility; A1407 A2301 with viability; A4113, A4119, A2001, A6307 with SQI and A1407, A6307, A2001, A5101 and A7304 with freezable sperm production. Similarly, in the analysis of post-thawed spermatozoa quality (PDC) the involvement of the following protein spots was identified: A507 with PDC motility and viability; A4119 and A1407 with PDC morphology; A7304, A4113 and A1407 with PDC SQI; A3218, A4113, A4106, A5101, A6307, A3011 and A7304 with fertility *in vitro* and A2001 with production of blastocysts.

The effect of the proteins on the behavior of sperm quality variables due to race (San Martinero and Zebu Brahman) recognizes significant differences among the spots A3218, A4704, A2301, A4119 and A4113 as potential proteins involved in explaining seminal volume changes; A4704, A6310, A4113 and A5101 related with sperm concentration; A409, A1407, A4119 and A5101 with sperm motility; A6310, A2301, A4113, A2001 and A4119 with sperm viability; A4119 and A4113 with sperm morphology; A4704, A3218, A2001, A4113 and A2301

Summary

with AQI, and A4704, A6310 and A4113 with freezable sperm production. In this sense, the analysis of post-thawed semen quality evaluated between races identifies the relation between proteins A1407, A6310, A2301, A4119 and A4113 with PDC sperm motility, A4119 and A4113 with PDC viability; A4704 with PDC morphology; A4704, A4119, A4113 and A6310 with PDC SQI; A2001, A4704 and A409 with fertility *in vitro*, and A4704, A409 and A2001 with blastocyst production.

The results concerning seminal plasma proteins concentration indicate that the season has effect ($p < 0.05$) on this parameter for the spots A7304, A3011 and A2301, and the race has an effect ($p < 0.001$) for spots A4113, A4119 and A2301.

The analysis of seminal plasma proteins in comparisons between better and lesser bulls of SM race, selected by reproductive behavior, for variables in fresh semen quality, post thaw spermatozoa quality, fertilization and production of blastocysts, evidence, overall, that there are not concretely defined proteins that specifically explain the difference between the San Martinero bulls, since the logical order expected is not found (better and less behavior). It is possible that this result is due to the small variation of reproductive efficiency of stallions selected for study in this race.

Moreover when the analysis is performed between the two best bulls of the breed SM and the two worse Zebu animals, there is a logical order expected for the point of protein A2301 with significant changes ($p < 0.05$) and this order is associated with the higher average of reproductive efficiency variables. This point could be defined as a possible BSP-A1 identified in bulls with good fertility (Moura *et al.*, 2007). On the other hand, protein spots A4113 and A4119 were observed in association with the bulls with lower averages in the variables responsible of reproductive efficiency.

These results are obtained when we compared the fertility levels (high and low average) at a general level between the two races. However, this does not mean that these proteins are the ones identifying the true fertility at a general level, but they are answers to visualize within the breed; this is so, that in the case of A4119 protein spot is the most widely expressed protein at a general level in Zebu whereas in SM, with very low concentrations, is directly associated with sperm viability.

Summarizing, as major contributions of the present study, we can say that this investigation allowed the first generation of uni and bidimensional reference maps of the races Zebu Brahman and San Martinero under tropical climatic conditions of Colombia.

The reproductive efficiency of San Martinero bulls for the rainy season in terms of indicators of sperm quality, *in vitro* fertilization and embryo development, studied in an integrated way, let us predict *in vivo* fertility. The values of these indicators in San Martinero race did not produce

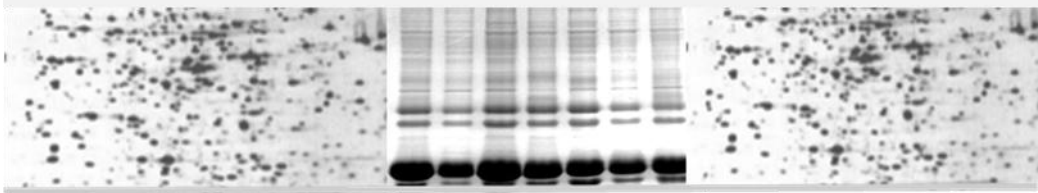
Summary

major changes due to the season (dry or wet), but they outweigh the reproductive efficiency indicators of breeding bulls of Brahman Zebu, results that allow infer that this breed, coming from Spain, is adapted to tropical conditions of Colombia.

The changes of the studied variables that determine the sperm quality of the bulls by the effect of the plasma proteins are the response for their participation in a cluster manner and not in an independently manner, that integrates, under a prediction model, proteins with and without significant changes. In this study, some models were recognized whose association explains the behavior of variables that account for semen quality (seminal volume, concentration, motility, viability and sperm morphology), SQI and sperm production, depending on the race, the climatic season, or according to whether it is fresh or frozen-thawed sperm.

Finally, this research identified that the protein A2301 is associated with the bulls selected as the most fertile, while A4113 and A4119, with molecular weights 15.37 and 15.49 kDa and pI of 5.38 and 5.15, respectively, were related to low fertility bulls.

III. INTRODUCCIÓN



III.INTRODUCCIÓN

La producción animal en un país tropical como Colombia se ve limitada, entre otros, por factores ambientales adversos, como temperatura, humedad relativa y radiación solar altas a lo largo del año, acompañadas de una baja disponibilidad de biomasa forrajera de baja calidad y por la proliferación de plagas y enfermedades. En los sistemas de producción bovina Colombiana existen razas como las criollas, con un buen grado de adaptación a las altas temperaturas características de nuestro medio tropical. Se explotan además razas de alta producción que muestran poco grado de adaptación al ambiente cálido tropical, lo que incide directamente en los bajos índices productivos y reproductivos de estos genotipos.

El calor altera la homeostasis del organismo, desencadenando mecanismos de termorregulación, que permiten mantener su temperatura corporal dentro de los rangos compatibles con la vida. Los animales sometidos a temperaturas y humedades relativas elevadas presentan disminución en el consumo de alimento, redistribución del suministro de sangre en el organismo y aumento de las pérdidas de calor por sudoración y respiración. Como resultado de los anteriores ajustes, se producen alteraciones en el funcionamiento del tracto digestivo, la absorción de nutrientes, el metabolismo celular y orgánico, el mantenimiento del equilibrio ácido-base, el balance hídrico, endocrino y la función renal. Los animales en estas condiciones disminuyen, la ganancia diaria de peso corporal y la producción de leche. En las hembras se presenta alteración del ciclo estral e incremento en la mortalidad embrionaria temprana, mientras que en los reproductores se observa una disminución en la calidad del semen. A pesar de estos cambios fisiológicos existen razas que se comportan eficientemente en condiciones adversas como la raza criolla San Martinero, la cual a nivel nacional ha sido la más evaluada desde el punto de vista ecofisiológico mostrando características de aclimatación y adaptación a las condiciones climáticas del trópico bajo húmedo.

Estos genotipos ayudarían a la mejor utilización de animales no adaptados mediante programas de cruzamientos. Los estudios realizados en esta raza en condiciones del trópico bajo han demostrado su superioridad a nivel de fertilidad *in vivo* tanto en el macho como en la hembra, (Velásquez *et al.*,1998b) Los trabajos que ha venido desarrollando el centro de reproducción animal (CRIA) de Corpoica en fertilidad y desarrollo embrionario *in vitro* y criopreservación, como tarea que le ha encomendado el gobierno nacional en la conservación de razas criollas Colombianas, le han permitido, con apoyo del centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), desarrollar sobre estas razas estudios que demuestren a nivel molecular el porqué de su eficiencia reproductiva, y poder de esta manera introducir estas bondades a las razas foráneas para mejorar sus índices de reproducción y adaptabilidad. En este sentido, con este trabajo de investigación que involucra las proteínas del plasma seminal y su asociación con la fertilidad *in vivo* e *in vitro* y desarrollo embrionario, se iniciaron los primeros estudios a nivel nacional hacia el año 2005, con apoyo de Ecopetrol, Colciencias y el MARD.

Introducción

El plasma seminal es una secreción fisiológica procedente de múltiples glándulas del tracto reproductivo del macho y es importante para el funcionamiento y sobrevivencia del espermatozoide. En los últimos años, los estudios del proteoma del plasma seminal han permitido identificar proteínas específicas en toros de alta y baja fertilidad, de tal manera que algunas de ellas puedan emplearse como biomarcadoras de fertilidad (Kumar *et al.*, 2012, Davalieva *et al.*, 2012). Las proteínas que contiene el plasma seminal del toro son principalmente de dos familias: espermadhesinas y un grupo con dominios fibronectina tipo II. Esta última familia es la que predomina en la especie bovina y está representada por las BSP, proteínas del plasma seminal que se encuentran en casi todos los mamíferos, (Manjunath *et al.*, 1987, 1989) y que modulan la espermatogénesis por activación de la liberación de fosofatidilcolina y colesterol de las células espermáticas. Scolari *et al.*, (2010) comprobaron que la BSP1 y BSP2 disminuyen o activan la movilidad rotacional del colesterol dentro de la membrana. Así mismo, están implicadas en la maduración de los espermatozoides, en el proceso de protección y el mantenimiento de la integridad de la membrana celular frente a agentes externos, incluyendo eventos que producirían una prematura capacitación y/o reacción acrosómica, como es el caso del proceso de criopreservación (Manjunath *et al.*, 1994a, Strzezek, *et al.*, 2005).

En este mismo orden, la fosfolipasa A₂ (PLA-2) se ha considerado como proteína asociada a la fertilidad (Miller y Winer 1990) que participa en la modificación lipídica de la membrana espermática durante la capacitación (Kelly *et al.*, 2006) y en la interacción espermatozoide-ovocito, siendo activada por la interacción con la zona pelúcida (Riffo y Párraga 1997), y al igual que a la plasmina seminal se le atribuyen acciones de preparación de la célula para la reacción acrosómica (Shivaji *et al.*, 1989). En el plasma seminal del toro se encuentran, además de las espermadhesinas, (Tedeschi *et al.*, 2000), la osteopontina (OPN) que se relaciona con toros de alta fertilidad (Souza *et al.*, 2008) y la clusterina, involucrada en procesos de agrupamiento, adhesión celular y maduración espermática (Ibrahim *et al.*, 2000). Por otra parte, se han detectado proteínas, como la proteína ácida del fluido seminal, (aSFP), albúmina, clusterina y de nuevo la osteopontina, relacionadas con la mejor facilidad para la congelación del semen y, de manera opuesta, la proteína P25b, que se comporta con actividad anticongelante, (Jobim *et al.*, 2009).

Aunque las bondades en la actividad reproductiva de algunas proteínas han sido referenciadas en los toros, trabajos que relacionen estas bondades en animales de edad madura con la fertilidad *in vivo* complementada con calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario *in vitro* no se evidencian. En este sentido el propósito de esta tesis es determinar las proteínas del plasma seminal asociadas a la calidad espermática, fertilidad *in vivo* e *in vitro*, y el desarrollo embrionario del toro criollo San Martinero teniendo en cuenta la época del año y compararlas con los datos obtenidos en la raza Cebú Brahman

OBJETIVOS

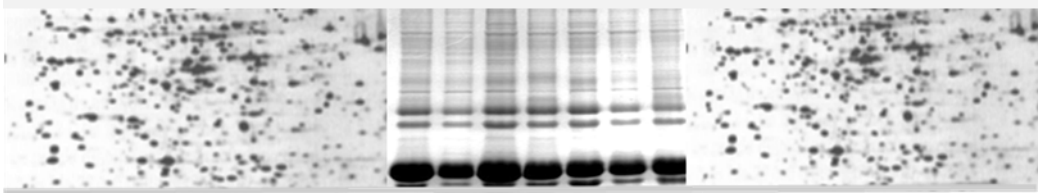
OBJETIVO GENERAL

Estudiar las proteínas del plasma seminal asociadas con calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario de ganado San Martinero al inicio de su etapa reproductiva comparadas entre las épocas del año seca y lluviosa y con la raza Cebú Brahman.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el perfil electroforético de toros de las razas San Martinero y Cebú al inicio de la edad reproductiva, en condiciones del trópico bajo Colombiano
- Definir diferencias o similitudes del perfil de proteínas del plasma seminal del toro San Martinero asociadas a los indicadores de calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario por efecto de la época lluviosa y seca.
- Establecer entre los toros de la raza San Martinero y Cebú Brahman asociaciones entre las proteínas del plasma seminal y los indicadores de calidad espermática, fertilidad y desarrollo embrionario.
- Relacionar proteínas del plasma seminal con el valor de fertilidad en toros San Martinero y compararlos con la raza Cebú Brahman.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En esta investigación, además de la raza criolla San Martinero, descendiente de razas Españolas, se evaluó la raza Cebú Brahman por ser la raza de mayor población en Colombia.

IV.1 CARACTERÍSTICAS DE LA RAZA CRIOLLA SAN MARTINERO



Figura 1. Toro reproductor de la raza San Martinero.

La raza bovina San Martinero (figura 1) proviene de los ganados introducidos por los conquistadores españoles en el segundo viaje de Colón, en 1493. A Colombia entraron por la isla Margarita (Venezuela), por la ruta de Arauca, Casanare y Barranca de Upia dando origen a los ancestros del toro criollo San Martinero.

La raza San Martinero (SM) se formó en el piedemonte llanero de la Orinoquia Colombiana, gracias al trabajo de la selección natural y al esfuerzo zootécnico de los jesuitas en el siglo XVII. Esta raza se ha adaptado a las subregiones del piedemonte y altillanura de la región Orinoquense, representativas de las zonas de Bosque Húmedo Tropical (BHT) y muy Húmedo Tropical (BMHT) (Holdrige Y Hunter, 1961) las cuales se caracterizan por su topografía plana y ondulada, suelos ácidos, con deficiencias minerales, especialmente de P, Cu, Zn y altos contenidos de Al, temperatura media de 26°C con variaciones bruscas durante las 24 horas del día, humedad relativa de 87% en la época lluviosa (abril a noviembre) y de 55 % en la época seca (noviembre a marzo). La precipitación varía entre 2700 (altillanura) y 3500 (piedemonte) mm³/año, con régimen monomodal de distribución de lluvias.

Revisión bibliográfica

Las condiciones ambientales y el sistema de manejo extensivo a que ha sido sometido, desarrollaron en el SM características de gran importancia económica, tales como rusticidad, resistencia, capacidad para vivir en grandes extensiones, donde los forrajes son escasos y las aguas distantes, cierta tolerancia a ectoparásitos y a condiciones extremas de temperatura y humedad, así como habilidad para utilizar forrajes fibrosos, constituyéndose en patrimonio biológico y económico para la provisión eficiente de alimentos(carne, leche), pieles y trabajo.

Sus características morfológicas y fisiológicas lo muestran como de anca caída y desprendimiento de cola alto, con pecho ancho, costillas arqueadas y grupa alargada, cabeza grande y fuerte con perfil rectilíneo y orejas pequeñas, redondeadas y con abundante cantidad de pelos. Los cuernos fuertes y bien implantados, de color claro en la raíz con tonos más oscuros en las puntas; en los machos son gruesos y dirigidos hacia adelante en forma de corona, mientras que en las hembras son en forma de lira (retorcidos hacia adelante, hacia atrás y arriba). Las extremidades son proporcionales al cuerpo con aplomos sólidos. La cola es gruesa, larga y cubierta de pelos que termina en una borla abundante de pelos largos, cuyo color está de acuerdo con el color del animal. Una de las particularidades de importancia económica en las hembras SM es su facilidad de parto puesto que la expulsión del feto se produce con la vaca en posición de pie en el 86 % de los casos, (Velásquez *et al.*, 2005), lo cual está relacionado con el pequeño tamaño de sus crías al nacer, factor que favorece la rápida recuperación posparto de las hembras y permite, en consecuencia, una acelerada re-concepción (Martínez, 1999).

IV.2. CARACTERISTICAS DE LA RAZA CEBÚ BRAHMAN



Figura 2. Toro reproductor de la raza Cebú Brahman.

Revisión bibliográfica

El toro Brahman (figura 2), se originó en el estado de Texas (Estados Unidos) y es el resultado del cruce con razas de origen Hindú, como Nelore, Guzerá, Red Sindi sobre Hereford principalmente. Llegó a Colombia hacia el año 1913, su biotipo varía entre el gris y el rojo. El Brahman en su gran mayoría posee piel oscura, es un animal de buen tamaño, cabeza ancha, perfil recto, cuello corto y grueso, con barbilla desarrollada. Sus orejas son de tamaño mediano, las costillas arqueadas y separadas entre sí, pecho profundo y ancho. El tronco es cilíndrico, con caderas amplias y musculosas, el anca es inclinada y la inserción de la cola es suave (Asocebú 2008).

Por sus grandes bondades, el Cebú Brahman ha sido catalogado como la raza para carne por excelencia en términos de precocidad, productividad, calidad de la canal, ganancia diaria de peso y rentabilidad. En líneas generales, el Brahman es ideal para la producción cárnica en países tropicales y se ha constituido incluso en opción válida para la producción de leche dentro de ciertos sistemas de doble propósito, al cruzarlo con razas especializadas.

Actualmente el Cebú Brahman es la base de la ganadería Colombiana, tanto en los sistemas productivos de doble propósito como en los definidos para carne. El Brahman constituye el 95% del inventario nacional del ganado Cebú (Asocebú 2010).

IV.3. ESTUDIOS COMPARATIVOS DEL GANADO SAN MARTINERO Y EL CEBÚ.

Los estudios realizados en el ganado San Martinero se han dirigido a su caracterización fisiológica, la respuesta reproductiva, la respuesta al estrés climático, comparados con el comportamiento de otras razas, además de los estudios etológicos, con el propósito de evaluar sus bondades o defectos en este medio tropical bajo y húmedo. Los estudios en el área de la reproducción han evidenciado que las novillas de raza San Martinero obtienen su primer parto a una edad promedio de 43.1 meses y la raza Cebú a los 45.4 meses. El promedio general del intervalo entre partos para el San Martinero es de 16.4 meses, valor inferior al reportado para la región y para el Cebú (18 y 17.3 meses respectivamente), (Martínez 1995 y Hernández, 1981). De otra parte, se evidenció mejor calidad espermática y mayor porcentaje de fertilidad en el toro San Martinero que en el Cebú, bajo condiciones del trópico bajo (Velásquez 1999 y Velásquez *et al.*, 1999a)

Los estudios realizados sobre el efecto del medio ambiente climático en la reproducción del macho y la hembra bovina (Figura 3), publicados en las memorias del III congreso Iberoamericano de razas criollas por Velásquez *et al.*, (1996), evidenciaron algunas ventajas comparativas sobre el ganado Cebú. En el toro adulto San Martinero se evidenció un buen control de la temperatura corporal bajo condiciones de radiación solar directa (Velásquez 1999). El principal mecanismo de control de la temperatura en este caso fue el incremento de

la frecuencia respiratoria a nivel superficial, por lo que posiblemente no esté alterando el estatus ácido básico (Velásquez *et al.*, 1998).

Por el contrario, en el Cebú, su proceso de termorregulación involucra la piel, que contiene gran cantidad de glándulas sudoríparas (Hansen 2004, Martínez 1999).



Figura 3. Área experimental del laboratorio de campo de bioclimatología del Centro de investigaciones de CORPOICA CI la Libertad.

IV.4.PROCESOS DE FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

Para la comprensión de los pasos que se suceden en los procesos de fecundación y desarrollo embrionario involucrados en el estudio es importante el entendimiento de algunos conceptos relacionados con el gameto femenino y masculino.

IV.4.1 Ovocito mamífero

El ovocito es el gameto femenino, considerado como la célula germinal haploide de los mamíferos y la célula de mayor tamaño del organismo, que al momento de ser ovulado naturalmente, adquiere la capacidad para ser fecundado en el oviducto (Sirad, 2011). Para el estudio de la capacidad fecundante y desarrollo embrionario, en donde se involucra el ovocito, se deben entender los eventos más relevantes desde su inicio en la vida embrionaria y su crecimiento, hasta su maduración nuclear y citoplasmática (Hulinska *et al.*, 2011). La formación de ovocitos se inicia en la vida embrionaria, con las células germinales o primordiales, a partir de células indiferenciadas, que se multiplican mitóticamente, para formar ovogonias que luego sufren división meiótica y se convierten en células haploides capaces de ser fecundadas (Baker, 1982).

Revisión bibliográfica

La meiosis se detiene dos veces, al momento del nacimiento y al momento de la ovulación, y se reactiva y completa al producirse la fecundación. En el momento del nacimiento, la hembra cuenta con una carga de 200.000 a 500.000 ovocitos primarios (incluidos en los folículos primordiales) que sufren una primera detención o arresto meiótico en estado dictiotene de la profase I, el cual es mantenido por varios factores entre los que se ha identificado al adenosin monofosfato cíclico (AMPc). En este estado, el ovocito se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (GV) (Eddy 1981), que permanecerá hasta que por influencia hormonal se reactive la meiosis y pueda completar el proceso de maduración y estar apto para ser fecundado. En este sentido, la maduración de los ovocitos en los mamíferos comprende dos etapas: un primer periodo de crecimiento y un periodo final de preparación o maduración nuclear y citoplasmática.

Durante el período de crecimiento, el ovocito aumentado de tamaño no tiene todavía la capacidad de sintetizar las proteínas necesarias para la reactivación de la meiosis. En la vaca, el ovocito termina su crecimiento con un diámetro aproximado de 145 μm -150 μm (Motlik y Fulka, 1986), y a partir de este momento adquiere la capacidad de reanudar la meiosis.

En cultivos *in vitro*, es importante seleccionar el tamaño de los ovocitos para garantizar que éstos puedan alcanzar la madurez. Sato *et al.* (1990) demostraron que los ovocitos con diámetro menor de 120 μm presentaron un gran porcentaje de maduración incompleta. La capacidad de alcanzar la etapa de ruptura de la vesícula germinal (GVBD) y llegar a metafase I es adquirida en las etapas iniciales de desarrollo, pero la habilidad de progresar a metafase II es adquirida en estados tardíos. La falla de los ovocitos pequeños para alcanzar la maduración puede deberse a la ausencia o insuficiencia de factores citoplasmáticos o nucleares requeridos para tal proceso, y que deben encontrarse en el citoplasma o núcleo (Sato *et al.*, 1988).

El período de maduración nuclear incluye la progresión desde el estado de dictiatio hasta la metafase de la segunda división meiótica. La descarga de LH, producida pocas horas antes de la ovulación e inducida por el propio ovocito, (Hyttel *et al.*, 1989), activa de nuevo la meiosis, hecho que se observa por la ruptura de la vesícula germinal (GVBD) desencadenando las distintas fases meióticas, hasta que tras la extrusión del primer corpúsculo polar (CP) se vuelve a detener la meiosis en la metafase de la II división, coincidiendo con la ovulación.

La maduración citoplasmática incluye transformación de las mitocondrias (Thibault *et al.*, 1987), gránulos corticales y retículo endoplasmático liso y rugoso (Hyttel *et al.*, 1989), que preparan al ovocito para ser competente en el bloqueo de la polispermia y de igual manera se produce síntesis de nuevas proteínas, como el factor del crecimiento del pronúcleo masculino (MPGF) y el factor promotor de la maduración (MPF). Además de estos eventos, se produce también mucificación y expansión del *cúmulus* que rodea al ovocito y una pérdida del número

Revisión bibliográfica

de las uniones intercelulares, entre las células granulosas, y entre éstas y el ovocito, lo que origina una interrupción en el transporte iónico entre *cúmulus* y ovocito (Thibault *et al.*, 1987; Hyttel, 1989).

El ovocito maduro está conformado por el ooplasma o citoplasma que contiene las estructuras de las células eucariotas: núcleo con su ADN, mitocondrias y retículo endoplasmático liso y rugoso con su propia membrana plasmática u oolema que se encuentra rodeado por la zona pelúcida (ZP).

La ZP se conforma como una matriz extracelular transparente desde los estados iniciales de foliologénesis, que interviene en la interacción ovocito/espermatozoide (Brewis y Wong 1999), la unión a los espermatozoides capacitados, la inducción de la reacción acrosómica (Florman y Storey, 1982), la protección del ovocito hasta la implantación temprana del embrión (Yonezawa *et al.*, 2001), el bloqueo de la polispermia (Yanagimachi, 1988, 1994), la penetración heteróloga, la protección del embrión en sus etapas iniciales de desarrollo, la prevención de su adhesión anticipada al endometrio y la transmisión de señales iniciales entre el embrión y la madre, entre otros (Wassarman *et al.*, 1999). La ZP y las extensiones citoplasmáticas que la atraviesan para mantener la comunicación intracelular por uniones tipo gap, se forma al finalizar la etapa de folículo primario, por síntesis de glicoproteínas desde el ovocito, desde las células del *cúmulus* y desde ambos dependiendo de la especie.

La ZP en mamíferos está constituida por cuatro glicoproteínas altamente glicosiladas, llamadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Wassarman, 1988, Lefievre *et al.*, 2004, Stetson *et al.*, 2012) nombradas en orden, según el tamaño de los cDNAs que codifican estos polipéptidos (Yonezawa *et al.*, 2001). Estudios realizados por Izquierdo-Rico *et al.*, (2009) encontraron que la matriz de la ZP de hámster también se compone de cuatro glicoproteínas. En cerdas y vacas está presente ZP4 pero no ZP1 (Goudet *et al.*, 2008). El grosor de la zona pelúcida, varía según la especie: 5µm en ratón, 13-16 µm en el cerdo, 20µm en la especie humana y 27µm en la vaca (Pelletier *et al.*, 2004)

En la mayoría de las especies, la adhesión de los espermatozoides a la zona pelúcida, está mediada por oligosacáridos de las glicoproteínas de la ZP, (Sinowatz *et al.*, 2001).

Velásquez *et al.*, (2004) demostraron que la interacción espermatozoide-ZP es un proceso dependiente de carbohidratos, mediado entre otros por el ácido siálico, con unión a 2,3 a N-acetil-lactosamina, contenida en las glicoproteínas de la ZP de ovocitos de vaca. El efecto observado al emplear el inhibidor de sialidasa sugiere la presencia de esta enzima en los gránulos corticales y su participación en el mecanismo de bloqueo de la polispermia.

El ovocito y el folículo preovulatorio sufren cambios probablemente iniciados por el pico de la hormona luteinizante (LH). En la vaca, la ovulación ocurre unas 24 horas después del pico de

Revisión bibliográfica

la LH y en este periodo de tiempo, completa su maduración, tanto nuclear como citoplásmica (Hyttel *et al.*, 1986, 1989).

Después de la ovulación, el ovocito en estadio de metafase II sale al oviducto y es transportado por las células oviductales hasta el lugar de la fecundación, donde esperará la llegada de los espermatozoides. La meiosis sólo se reanuda si se produce la fecundación, liberándose en ese momento el segundo corpúsculo polar (CP) como señal de haber terminado completamente las dos divisiones del proceso meiótico.

Después de la ovulación, los espermatozoides parecen liberarse gradualmente del cérvix y del istmo oviductal de manera regulada y llegan en bajo número al sitio de la fecundación (Hunter, 1996). Este fenómeno ha sido considerado como un mecanismo para reducir el riesgo de polispermia (Chian y Sirard, 1995, Coy y Avilés, 2010)

Cada una de las partes del oviducto cumple una función fisiológica: Las fimbrias y el infundíbulo se encargan del transporte del ovocito después de la ovulación, en la ampolla se produce la fecundación y en el istmo se depositan los espermatozoides y transportan gametos y embriones (Hunter 1984).

IV.4.2. Semen de mamíferos

Esta compleja suspensión está formada por los espermatozoides y el plasma seminal que los transporta. Contiene secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductivo masculino (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbo uretrales). El volumen eyaculado varía por diversos aspectos, tales como especie, raza, edad, individuo, estado fisiológico, frecuencia de eyaculados, métodos de recolección, alimentación, sanidad y factores medio ambientales. En toros el eyaculado puede ir de 1-15 cc, con un promedio de 4-6 cc, con una concentración aproximada de 800-2000 millones espermatozoides/mL, un pH de 6.4 a 7.8 y una concentración de proteína de 6.8 gr/100 ml (Hafez 2002). La mezcla de espermatozoides con el plasma seminal le confiere al semen eyaculado una consistencia densa, cremosa y un color blanquecino o ligeramente amarillento. Estos parámetros se asocian con la concentración de espermatozoides (Barth *et al.*, 2000).

El semen contiene entre otros compuestos como fructosa, sorbitol, ácido cítrico, sodio, potasio, calcio, magnesio y glicerolfosforilcolina. Las características de su composición varían de una especie a otra, incluso existe una variabilidad muy grande entre individuos de la misma especie y entre eyaculados del mismo animal (Hidalgo *et al.*, 1995). Esta heterogeneidad funcional, que afecta al espermatozoide y que se presenta entre individuos, eyaculados y población de espermatozoides eyaculados, puede ocasionarse por diferencias intercelulares durante la espermiogénesis, por el proceso de maduración dentro del epidídimo, (donde se

afecta su membrana espermática), e incluso como respuesta al medio ambiente (Holt y Van Look 2004)

IV.4.2.1. Espermatozoide mamífero

El espermatozoide es una célula haploide terminal, que carece de retículo endoplasmático rugoso, por lo que es incapaz de tener procesos de transcripción y traducción. Deben sobrevivir en el tracto reproductivo femenino sin el beneficio de los mecanismos de reparación que tienen muchas otras células y su viabilidad decrece sustancialmente al poco tiempo de haber sido eyaculado. Se altera durante procesos como la criopreservación, donde se puede producir un daño irreversible a las membranas plasmáticas, causando ya sea la muerte celular o cambios parecidos a los que se ven durante la capacitación espermática, lo que dificulta o altera su capacidad para interactuar con el ovocito durante la fecundación (Cormier *et al.*, 1997, 2003). Su función principal es el transporte del genoma nuclear y fecundar el ovocito (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Durante su vida, el espermatozoide enfrenta cambios considerables en su entorno, desde el momento de su formación, proceso de maduración, eyaculación, ingreso al tracto reproductivo femenino y fecundación. El espermatozoide interactúa con su medio ambiente inmediato y la membrana plasmática sirve como una doble vía de comunicación (Leahy y Gadella 2011).

Los espermatozoides de los mamíferos son células alargadas que constan de cabeza y cola (Yanagimachi, 1994) (figura 4). Sus principales componentes químicos, son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos.

La cabeza está conformada por lipoproteínas, contiene el núcleo de forma ovalada y aplanado, en cuyo interior se encuentra el material genético, ácido desoxirribonucleico, dispuesto a manera de cromatina altamente compacta y proteínas básicas llamadas histonas espermáticas y protaminas que son pequeñas histonas de bajo peso molecular, importantes en la condensación y estabilización del DNA, las cuales se mantienen unidas por grupos sulfhidrilo (Mann y Lutwak-Mann (1981). La parte anterior del núcleo presenta el acrosoma o capuchón cefálico, que cubre más de la mitad del área de la cabeza y núcleo espermático, contiene mucopolisacáridos y está conformado por dos membranas, interna y externa, en cuyo interior están presentes enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialuronidasa e hidrolasas (Jansen *et al.*, 2001) y algunas proteasas. El tamaño de la cabeza y forma varían considerablemente entre las diferentes especies, siendo su estructura básica la misma en la mayoría de los mamíferos (Yanagimachi, 1981).

La cola está conformada por fosfolípidos, lipoproteínas y enzimas. La principal proteína flagelar es la dineína, relacionada con su movimiento. El flagelo se divide en porción media,

Revisión bibliográfica

principal y terminal. La zona central de la pieza media, a lo largo de toda la cola, constituye el axonema, compuesto por 9 pares externos de microtúbulos, en disposición 9 + 2, rodeados por 9 fibras densas. Esta disposición cubierta por mitocondrias, genera la energía necesaria para la motilidad espermática, permitiendo un movimiento deslizante que genera ondas curvadas en la cola (Hafez, 2002). Los estudios de Moreno y Schatten (2000), sugieren que en el proceso de la espermatogénesis las espermátidas se someten a un reordenamiento importante microtubular, que induce o permite el movimiento de orgánulos de la célula. Esta configuración microtubular nueva se asocia con un aumento en los microtúbulos. La nueva estructura del citoesqueleto puede estar asociada con los acontecimientos migratorios que ocurren en la diferenciación.

Las anteriores estructuras se encuentran rodeadas por la membrana plasmática, muy permeable, químicamente acidorresistente y conformada por proteínas y lípidos.

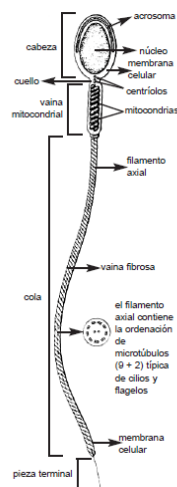


Figura 4. Estructura del espermatozoide mamífero (Tomado de Hafez 2002).

El proceso de formación y maduración de los espermatozoides es largo pero ordenado y ocurre en los túbulos seminíferos del testículo. En el toro tiene una duración total de 61 días. (Esponda 1985).

El espermatozoide mamífero sufre modificaciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas inicialmente en el testículo (maduración testicular). Posteriormente cuando los espermatozoides de los mamíferos salen del testículo, muestran una morfología altamente especializada, sin embargo, todavía no son capaces de fecundar el ovocito. Los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante durante la maduración epididimaria, que ocurre en el tránsito por el epidídimo, largo tubo contorsionado, que al distenderse mide unos 40 m en el toro. El tiempo de tránsito por el mismo es de unos 3 a 16 días según la

Revisión bibliográfica

especie. En el epidídimo adquiere factores esenciales (Toshimori, 2003 y Caballero *et al.*, 2010), en sus tres porciones: la cola del epidídimo que actúa además como reservorio de espermatozoides, la cabeza y el cuerpo que se encargan de la maduración espermática. Las secreciones de esta estructura contribuyen a la adquisición de la motilidad (Tulsian 2006). La habilidad de reconocer y fusionarse con la zona pelúcida y oolema del ovocito, y la capacidad de penetración se obtienen sólo después del tránsito a través del epidídimo, durante el cual los espermatozoides viajan desde el testículo a los conductos deferentes (Moura *et al.*, 2007a) y son necesarias para que finalmente el espermatozoide pueda alcanzar la capacidad fecundante (Cooper 2007).

A su paso por el epidídimo, la estructura de la membrana plasmática es remodelada, tanto a nivel de proteínas como de fosfolípidos y localización de dominios del espermatozoide. La mayoría de las proteínas testiculares son degradadas por sistemas proteolíticos (Seaton *et al.*, 2000) y a su vez se integran a la membrana espermática, durante su tránsito, nuevas proteínas secretadas por cabeza y cuerpo del epidídimo (Gatti *et al.*, 2004).

Los mecanismos moleculares exactos que sufren estas células aún no están completamente caracterizados, pero los acontecimientos que ocurren modifican la superficie de la membrana espermática. Diversos estudios han demostrado que incubando espermatozoides epididimales con cultivos primarios de epitelio epididimal se promueve la motilidad espermática y la capacidad del espermatozoide de unirse a ovocitos, y que proteínas secretadas andrógeno dependientes de las células epididimales pueden estar involucradas en los procesos de maduración (Moore 1996). Por otra parte, los estudios de Tulsian (2006) señalan la participación de residuos de glicohidrolasa y glicosiltransferasas que añaden residuos de azúcares a los gliconjugados existentes.

El fluido del epidídimo es más complejo de lo que se pensaba anteriormente. Las proteínas secretadas por el epidídimo son comunes en las distintas especies y muestran actividad enzimática, capaces de controlar los cambios de la superficie de los espermatozoides. Estas proteínas están disueltas en compartimientos como vesículas exosomales, estructuras membranosas llamadas epididimosomas (Gatti *et al.*, 2004). Estos epididimosomas se fusionan con la membrana plasmática del espermatozoide. El epidídimo también activa y degrada enzimas presentes en la superficie de los espermatozoides, lo que les permite modificar las proteínas en la membrana de los mismos (Marengo, 2008).

Además en el proceso de maduración funcional espermática, el epidídimo interviene en los siguientes procesos: concentración de espermatozoide, almacenamiento de espermatozoides en estado de quiescencia hasta la eyaculación, remoción de espermatozoides degenerados, provisión de condiciones apropiadas para la supervivencia de los espermatozoides, protección del espermatozoide y mantenimiento de la barrera epididimal sanguínea entre otras (Marengo, 2008).

La eliminación de los espermatozoides defectuosos y la degradación de algunos constituyentes de las proteínas son procesos controlados por el sistema degradación/reciclaje, conocido como el sistema Ubiquitina. La ubiquitina es una pequeña proteína formada por 76 aminoácidos, con peso molecular de 8,6 kDa, cuya principal función es la proteólisis, marcando otras proteínas para su destrucción (Toshimori, 2003).

Bajo control androgénico, el epitelio epididimal secreta proteínas que pueden interactuar secuencialmente con la superficie del espermatozoide. Algunas de las proteínas espermáticas adquiridas durante la maduración se comportan como proteínas integrales de la membrana (Sullivan *et al.*, 2005).

IV.4.2.2. Plasma seminal

El plasma seminal es una mezcla compleja de secreciones de los testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, ampolla, próstata, glándulas bulbo uretrales, Figura 5) que sirve de vehículo para transportar el espermatozoide eyaculado y tiene funciones de protección al espermatozoide (Mann y Lutwak-Mann, 1981; Manjunath y Therien 2002). El pH del plasma seminal varía desde 6.7 hasta 7.4 en las especies domésticas y tiene el potencial para neutralizar el pH ácido vaginal. Durante el apareamiento, el pH aumenta de 4.3 a 7.2 dentro de los 8 segundos de la llegada del espermatozoide. Adicionalmente el plasma seminal contiene inhibidores de la respuesta inmune, que cubren los espermatozoides (Dostal *et al.*, 1997)

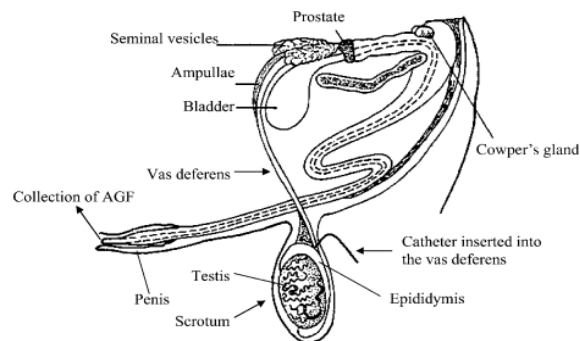


Figura 5. Glándulas sexuales accesorias del toro. Hafez 2002.

La composición del plasma seminal varía con la especie, según los órganos que surten los elementos que lo componen. Los principales componentes, son: agua 75%, iones orgánicos e inorgánicos, minerales como Na^+ y K^+ , y en menores cantidades Zn^{++} , (ayuda a la estabilización de moléculas y actúa como antimicrobiano), Ca^{++} , (interviene en la capacitación y reacción acrosómica), Cu^{++} , Fe^{++} , azúcares como fructosa, prostaglandinas, sorbitol, ácido cítrico, ácido ascórbico, péptidos, proteínas con diversas y contrastantes funciones, lípidos

Revisión bibliográfica

(glicerol fosforil colina), ácidos grasos, aminoácidos como carnitina, taurina e hipotaurina (proporcionan energía y protección contra sustancias oxígeno reactivas), inmunoglobulinas como Ig A, hormonas y numerosas enzimas como acrosina, nucleasas y proteasas inhibitorias, (actúan en la digestión de espermatozoides muertos y/o dañados y protegen contra sustancias oxígeno reactivas) (Zini *et al.*, 1993), Sus componentes le proporcionan energía para abastecer el metabolismo aeróbico y anaeróbico de los espermatozoides (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

El plasma seminal puede inhibir y estimular la función del espermatozoide y su fertilidad, a través de acciones multifuncionales de componentes orgánicos e inorgánicos. Así, el plasma seminal ejerce sobre los espermatozoides funciones que se refieren principalmente a nutrición, protección, regulación de la motilidad, capacitación de los espermatozoides, reconocimiento y unión entre gametos y de una manera indirecta su acción sobre el tracto genital de la hembra, produciendo un incremento de las contracciones uterinas, una modulación de la respuesta inmune y una relajación del istmo oviductal (Johnson *et al.*, 2000).

Por otra parte la manipulación *in vitro* del espermatozoide para los diferentes procesos de reproducción asistida, tales como dilución, enfriamiento, congelación, calentamiento y clasificación, sexaje de espermatozoides por citometría de flujo, pueden alterar el plasma seminal y modificar la unión de proteínas a la superficie espermática, lo que desestabiliza las membranas y puede pre-capacitar el espermatozoide, acortando o reduciendo su duración o tiempo de vida fértil. Estos cambios pueden ser reversibles por fracciones del plasma seminal, pero las respuestas varían en función del tipo de pre-tratamiento realizado al espermatozoide (Maxwell 2007).

La composición del plasma seminal es variable entre las diferentes especies, individuos de la misma especie, eyaculados del mismo individuo, por efecto del estado fisiológico, por influencia del medio ambiente, como ocurre en los países estacionales (Pérez-Pé *et al.*, 2001a), por el estado nutricional o por estrés climático. En cerdos, se presentan variaciones en las diferentes fracciones de plasma seminal dentro de un mismo eyaculado. Zhu *et al.*, (2000) preincubaron espermatozoides con diferentes fracciones del plasma seminal y encontraron diferencias ($p < 0,001$) en los porcentajes de penetración *in vitro*, siendo la primera fracción del eyaculado la de mejores resultados frente a las otras fracciones. Estas variaciones posiblemente están relacionadas con los diferentes perfiles proteicos de cada fracción del eyaculado.

La composición definitiva del plasma seminal puede variar a diario; cambia inmediatamente tras la eyaculación debido a que algunos componentes plasmáticos se adhieren al espermatozoide (Russell, *et al.*, 1984, Shivaji y Scheit 1990) y a su vez, algunos componentes celulares abandonan la célula debido a la gran permeabilidad de su membrana. Además, el plasma seminal sufre una rápida proteólisis incluso después de ser separado de las células.

Este fenómeno de variación en la composición proteica, es evidente en especies con reproducción estacional (Pérez-Pé *et al.*, 2001a).

IV.4.2.3. Eyaculación.

En el toro, la eyaculación se produce por el estímulo táctil que ejercen sobre el pene la temperatura de la vagina y el deslizamiento del moco. El semen es depositado en el extremo craneal de la vagina y en el cérvix por varias pulsaciones eyaculatorias del pene. La actividad contráctil de la vagina y miometrio es muy importante en el transporte dentro y a lo largo del útero, donde los espermatozoides invaden las glándulas endometriales en su camino al oviducto donde se le ofrece un ambiente favorable que le permite sobrevivir y formar un reservorio. Allí debe sufrir unos cambios (capacitación) que le permiten prepararse para adquirir capacidad fecundante y enfrentarse a otro medio, cuando atraviesa las células del *cúmulus* y zona pelúcida del ovocito (Hafez 2002).

Durante la eyaculación, el espermatozoide pasa del entorno del epidídimo, con condiciones hipertónicas, a las condiciones isotónicas de las secreciones de glándulas sexuales accesorias que conforman el plasma seminal y fluidos del tracto genital femenino (Petrunkina *et al.*, 2007). Cuando ingresa al tracto reproductivo femenino, los espermatozoides son sometidos a esfuerzos físicos durante la eyaculación y las contracciones del tracto genital y debe sostener el daño oxidativo. Al ingresar al sistema reproductivo de la hembra, los espermatozoides se convierten en organismos antigénicos, por lo que deben también superar el ataque del sistema inmune de la hembra (Austin 1951 y Chang 1951)

IV.4.2.4. Calidad espermática

La valoración de la calidad espermática sigue siendo una de las herramientas de evaluación más empleadas en la selección de reproductores. Sin embargo sus resultados expresan el potencial reproductivo al momento del análisis ya que su calidad puede cambiar bastante rápido dependiendo de fuentes de variación que alteren el proceso de la espermatogénesis (Barth *et al.*, 2000, 2003).

Para la determinación de la calidad se consideran especialmente: la motilidad, concentración, morfología y viabilidad. La evaluación de la concentración, motilidad y viabilidad espermática es frecuentemente utilizada para valorar la calidad del semen, pero provee información limitada acerca del potencial reproductivo de los toros (Hidalgo, 1995). El eyaculado del toro debe evaluarse de manera integral, con valoraciones cuantitativas y cualitativas. La evaluación de rutina incluye: volumen, concentración, vitalidad espermática, motilidad progresiva, morfología, estado e integridad de la membrana plasmática y del acrosoma, en razón a que

existe relación de estos parámetros con la fertilidad real del animal (Manjunath *et al.*, 1994b, 2002)

IV.4.2.4.1. Motilidad

En la mayoría de las especies, los espermatozoides maduros se mantienen inmóviles en el epidídimo hasta que salen durante la eyaculación y se produce la activación de la motilidad, donde el flagelo muestra golpes casi simétricos empleados para su propulsión en la trayectoria progresiva, casi lineal (Ho *et al.*, 2002). El papel del pH es importante durante la activación del espermatozoide. Un aumento en el pH intracelular se asocia con la adquisición de la motilidad progresiva cuando los espermatozoides son liberados de la cola del epidídimo (Caballero-Campo 2006).

La motilidad, se considera uno de los parámetros más importantes de valoración de la calidad seminal ya que muestra la capacidad de transporte espermático a lo largo del tracto reproductivo femenino y tiene incidencia directa en la penetración del ovocito (Yeung 2000). Sin embargo, aunque tiene correlación con la fertilidad (Pérez-Garnelo 2005), la motilidad no es sinónimo de capacidad fecundante ya que es indispensable la funcionalidad de otras estructuras espermáticas (acrosoma, membrana espermática) para que el proceso de fecundación se lleve a cabo. Además, se ha demostrado que espermatozoides con la membrana dañada pueden mostrar buena motilidad (Valcarcel *et al.*, 1994), debido a que pierden antes la capacidad de fecundación que el movimiento. Sin embargo hay estudios que sugieren que la motilidad es un buen indicador de calidad (Orgal *et al.*, 2011).

Existen varias técnicas de valoración de la motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple, pero subjetiva, es la valoración visual para la motilidad masal e individual (Barth 2003). Existen métodos más objetivos, que evalúan con gran precisión la calidad seminal, tales como CASA (Computer Assisted Motility Analysis), sistema computarizado de medición de imágenes, que se basa en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento (Watson 1990, Castellini *et al.*, 2011) y analiza múltiples imágenes digitalizadas mediante cámaras de video, haciéndole un seguimiento a las células espermáticas en imágenes sucesivas y estableciendo trayectorias definitivas que se procesan matemáticamente y obteniendo así resultados numéricos precisos. Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad de movimiento sobre la base de varios descriptores, las trayectorias que realizan la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que efectúa. Actualmente existen en el mercado varios tipos de CASA, que capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto en tiempo real, como de manera diferida, aportando un gran volumen de información (Hidalgo 1995 *et al.*, Castellini *et al.*, 2011).

IV.4.2.4.2. Concentración

Existe gran variabilidad en la concentración espermática de un eyaculado a otro, aun siendo de un mismo toro (Franken y Oehhinges, 2012), de ahí la importancia de conocer el número de espermatozoides por eyaculado. Este parámetro puede calcularse por métodos de recuento celular con cámara de Bürker, Neubauer o Thoma, y por métodos indirectos como espectrofotometría, que mide el espectro de luz monocromática absorbida o dispersa por los espermatozoides de una dilución conocida, comparándolo con un patrón establecido. Este método se basa en que la concentración espermática está directamente relacionada con la absorbancia de la muestra seminal (Gadea 2002). Así mismo se puede determinar por citometría de flujo, que es un método directo más sofisticado que determina el número de partículas en un determinado volumen.

IV.4.2.4.3. Morfología

La variación morfológica de los espermatozoides se origina durante la espermatogénesis, por efecto del genotipo (Gomendio *et al.*, 2000). El éxito de la fertilidad está asociada, entre otras cosas, a la morfología espermática (Sun *et al.*, 2012, Franken y Oehhinges, 2012), la cual es un indicador de gran importancia en la evaluación de la calidad espermática.

Para determinar la morfología se establece la proporción de espermatozoides anormales en el extendido del eyaculado, clasificando esta anomalía según se presente en la cabeza, cola y presencia de gota citoplasmática (Bonet Y Briz 1991). La presencia de altos porcentajes de espermatozoides con gota citoplásmica se ha asociado a la inmadurez sexual en toros, aunque no pueden excluirse procesos degenerativos, que comprometen la capacidad fecundante. Esta anomalía desaparece cuando los toros alcanzan la madurez sexual (Amann *et al.*, 2000).

La determinación de morfoanomalías es un carácter compensable dentro de la evaluación reproductiva, cuando no son generalizadas. Se acepta máximo un 20% de morfoanomalías (Pérez-Garnelo 2005).

En la actualidad, se pueden emplear análisis automatizados para identificar subpoblaciones de un eyaculado total (Pérez-Pé, 2002), que permiten determinar la morfología espermática de una manera más exacta y en especial siguiendo un procedimiento reproducible que va a permitir comparar eyaculados y fertilidad en los toros de manera más fiable (Marnet *et al.*, 2000).

IV.4.2.4.4. Viabilidad espermática

Determina la proporción de espermatozoides vivos y muertos. La integridad de la membrana plasmática está asociada con la viabilidad celular (Flesch *et al.*, 2000). Este es un aspecto muy importante a tener en cuenta, en especial si se trata de semen que ha sido criopreservado y descongelado para procesos de fecundación *in vivo* o *in vitro* ya que durante estos procesos se altera fácilmente la membrana plasmática y acrosomal, con cambios en su organización, permeabilidad y composición lipídica (Hidalgo *et al.*, 1995).

Para la valoración de la membrana se emplean reactivos fluorescentes de contraste, fluorocromos como el DCF (Diacetato de fluoresceína) en combinación con Ioduro de propidio, donde el DCF penetra en el espermatozoide intacto, dando fluorescencia verde por toda la membrana y el ioduro de propidio penetra únicamente en los espermatozoides con la membrana dañada, uniéndose al DNA y dándoles una intensa fluorescencia roja (Harrison y Vickers 1990). El Bromuro de etidio o el Hoechst 33258 tiñen el DNA del núcleo. En este caso la evaluación morfológica de la integridad de la membrana plasmática se realiza usando la óptica de contraste de fases y las tinciones supravitales, como el verde rápido/eosina o azul de tripán/Giemsa, entre otros.

IV.4.2.4.5. Integridad o estado del acrosoma.

Tinciones como Giemsa, eosina-nigrosina, tinciones dobles y triples, basadas en la combinación del azul de tripán con otros colorantes y anticuerpos acrosomales específicos, marcados con fluoresceína, permiten evaluar el estado del acrosoma. El uso de la microscopia óptica de contraste de fases (100x-1000x), previa fijación con Glutaraldehído además de evaluar la integridad del acrosoma sirve para determinar morfo-anomalías espermáticas.

IV.4.2.4.6. Efectos de la variación climática sobre la calidad espermática

El estrés calórico tiene grandes efectos sobre la reproducción, tales como interrupción de la espermiogénesis, alteración del desarrollo ovocitario, maduración del ovocito y del desarrollo embrionario temprano en sus etapas iniciales, así como del desarrollo placentar, fetal y el proceso de lactación. Estos efectos nocivos son el resultado de ajustes fisiológicos hechos por el animal para regular su temperatura corporal ante situaciones de estrés calórico. Uno de los efectos del estrés calórico sobre los gametos y las etapas iniciales del desarrollo embrionario es el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Cambios drásticos de temperatura pueden causar hasta la muerte del animal por alteración en la estructura proteica. Sin embargo es posible la adaptación genética al estrés calórico, respecto

Revisión bibliográfica

a regulación de la temperatura corporal y resistencia celular a elevadas temperaturas (Hansen 2009). El estrés calórico puede causar interrupción en los procesos reproductivos a través de dos mecanismos: primero, cambios homeocinéticos que regulan la temperatura corporal y que pueden comprometer la función reproductiva. Uno de los mecanismos de defensa del organismo contra el estrés calórico es reducir el consumo de alimento, lo que conlleva a una reducción en la producción metabólica de calor, e igualmente a cambios en el balance energético y en la disponibilidad de nutrientes, que pueden tener grandes efectos sobre la ciclicidad reproductiva, el establecimiento de la preñez y el desarrollo fetal.

En el macho, la presencia de los testículos suspendidos en el escroto, fuera de la cavidad abdominal y el intrincado sistema de termorregulación del plexo pampiniforme, permiten mantener la temperatura del testículo más baja que la temperatura corporal y son requisito necesario para mantener la espermiogénesis y minimizar las mutaciones del DNA. Sin embargo, las bajas temperaturas no son absolutamente necesarias para mantener la espermiogénesis, como sucede en los pájaros. El estrés oxidativo es la mayor causa de daño térmico de las células espermáticas, que conlleva a apoptosis y ruptura de las cadenas de DNA (Pérez-Crespo *et al.*, 2008).

Cambios estacionales en la composición del semen del carnero están acompañados con cambios en la concentración espermática de los eyaculados y en la fertilidad o en la congelabilidad del semen. Los contenidos de proteína en el plasma seminal varían con el cambio de estación, así como el mantenimiento de la motilidad espermática, volumen seminal, y número de espermatozoides. En la época de monta de carneros, (enero a junio) se detectaron varias bandas de proteínas de 20 a 70 kDa., cuya concentración disminuyó en la época de descanso sexual 36.9 mg /ml vs. 23.0 mg /ml ($P \leq 0.001$) y se observó una reducción en la velocidad congelación-descongelación. Estas proteínas que se adsorben a la superficie del espermatozoide han sido reportadas como beneficiosas sobre la viabilidad del espermatozoide después del tratamiento del choque-frío (Paula-Lopes, 2003).

Por otra parte, hay indicios de que el desarrollo del embrión resultante puede ser reducido si la fecundación es realizada por un espermatozoide expuesto al choque de calor (Paula-Lopes *et al.*, 2003).

Las características seminales no son inmediatamente afectadas. En el toro, donde la espermatogénesis tarda 61 días, las alteraciones en el semen se evidencian dos semanas después del estrés calórico y no retorna a la normalidad hasta 8 semanas o más después de haberlo sufrido. Chacur *et al.*, 2011, en su estudio de la influencia de la estación verano e invierno sobre las proteínas del plasma, señala un cambio significativo sobre la composición y porcentajes de bandas proteicas.

Revisión bibliográfica

El estrés causa hipertermia en escroto y testículos, lo que altera severamente la calidad morfológica y funcional del espermatozoide (Hansen 1997), ocasionando deterioro de la fertilidad en los meses de mayor calor.

La Falci *et al.*, (2002) investigaron los cambios estacionales en proteínas del plasma seminal en ganado caprino y encontraron importantes diferencias en la afinidad de algunas proteínas a la heparina. En este mismo estudio se evidenció la presencia de una banda de proteína de 178 kDa, solo en la estación de monta; así mismo se observó una disminución de una banda de proteínas de 199 kDa y un incremento en las bandas de proteínas del rango de 73 a 104 kDa. Las proteínas ligadas a la heparina mostraron actividad fosfolipasa A2 (PLA2), que fue 4.4 veces mayor en la estación de no monta que en la de monta. Los sitios de unión para HAP (heparin-affinity proteins, proteínas afines a la heparina), fueron identificados en la superficie del espermatozoide, particularmente en la pieza media. Estos resultados indican que las proteínas del plasma seminal de machos cabríos están bajo control estacional y asociadas con la función espermática durante las estaciones de apareamiento y no apareamiento.

En la hembra, el estrés calórico también altera la funcionalidad del ovocito, el crecimiento folicular y la expresión génica (Roth *et al.*, 2004). Otro efecto que se presenta es la disminución en la secreción de LH (Wise *et al.*, 1988) e incremento en la secreción de FSH por disminución de la circulación de inhibina, lo cual incrementa la presencia de folículos pequeños y medianos (Roth *et al.*, 2004). Los daños ocasionados al ovocito durante el período preovulatorio por el shock calórico producen la generación de especies reactivas de oxígeno (Roth *et al.*, 2001). La apoptosis ocurre en un 15-30% de ovocitos expuestos a elevadas temperaturas. De igual manera, la preimplantación embrionaria es susceptible al estrés calórico maternal, pero la susceptibilidad declina en la media que aumenta el desarrollo.

Las diversas respuestas al estrés calórico, como la variación alélica de genes que controlan la regulación de la temperatura corporal y resistencia al calor, han resultado en la existencia de razas genéticamente más resistentes a tolerarlo (Hansen 2009).

IV.4.3. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO

IV.4.3.1. Transporte y almacenamiento de gametos a través del oviducto

Los espermatozoides después de depositados en la vagina de la vaca, viajan rápidamente y en 15 o 20 minutos ya se encuentran en el oviducto; esta es la fase de transporte rápido. El oviducto juega un papel primordial en la reproducción de mamíferos domésticos, no sólo participa en el transporte del ovocito y el espermatozoide al sitio de la fecundación, sino que también proporciona el microambiente para el proceso de fecundación y etapas iniciales del

Revisión bibliográfica

desarrollo embrionario. En la fase de transporte lenta, el espermatozoide tarda mínimo 6-12 horas, donde se prepara para fecundar el ovocito. En esta fase es cuando se conforma un reservorio de espermatozoides, principalmente en el istmo hasta el momento de la ovulación (Hunter y Wilmut 1983, Katz *et al.*, 1989, Bosch y Wright 2005).

La migración de los espermatozoides en el tracto genital femenino parece estar fuertemente influenciada por las secreciones viscosas de glicoproteínas, que se acumulan en el istmo del oviducto antes de la ovulación, así como el entorno generado en el ampolla, por la suspensión post-ovulatoria del ovocito, células del *cúmmulus* y espermatozoides, líquidos foliculares y peritoneal (Hunter *et al.*, 2011)

El reservorio de espermatozoides en el istmo oviductal cumple varias funciones importantes, como la pérdida de los factores decapacitantes como muco polisacáridos y proteínas, que habían aportado las glándulas sexuales accesorias, iniciándose así el proceso de la capacitación, en el cual el espermatozoide adquiere el potencial para hiperactivarse y para lograr la reacción acrosomal (Olivera *et al.*, 2006), contribuye además a evitar la polispermia, al permitir la retención efectiva de gametos masculinos en esta región, evita un exceso de espermatozoides en la ampolla y en la unión istmo-ampular, que son los sitios de la fecundación, selecciona los espermatozoides por calidad, permite la capacitación espermática y mantiene la viabilidad espermática entre otros (Waberski *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que los espermatozoides de toros pueden mantener su capacidad fecundante por más de 48 horas (*in vitro*) siempre y cuando permanezcan unidos por su porción rostral del acrosoma al endosalpinx, lo que no ocurre si se unen a otros. La permanencia del espermatozoide en el reservorio oviductal de la vaca es de 18-20 horas (Hunter 1984).

El fluido oviductal representa el medio acuoso en el cual se transportan los gametos femenino, masculino y los embriones durante su tránsito al oviducto (Leese 1988, Burkman *et al.*, 1984).

Secreciones de glicoproteínas viscosas que se acumulan en el istmo del oviducto antes de la ovulación son importantes para el tránsito y avance del espermatozoide. La viscosidad de todos los fluidos del tracto reproductivo responde a variaciones cíclicas en la temperatura que ocurren en el oviducto cerca del momento de la ovulación (Hunter *et al.*, 2011).

En la formación del reservorio de espermatozoides a nivel oviductal influyen varios factores, tales como, diferencias regionales en la composición del fluido oviductal, o la existencia de un gradiente de temperatura a lo largo del oviducto (Nichol *et al.*, 1992). Estas variaciones de temperatura pueden reflejar diferencias regionales en el flujo vascular y linfático, que a su vez puede afectar la composición del fluido oviductal. Aunque de baja magnitud, estas diferencias de temperatura entre la ampolla y el istmo inhiben directa o indirectamente la motilidad del

Revisión bibliográfica

espermatozoide y contribuyen a la formación de un depósito de espermatozoides (Hunter y Nichol 1986).

Después de la ovulación, los espermatozoides se liberan gradualmente desde el depósito en el istmo caudal y ascienden a la ampolla, asegurando la monospermia. Cambios ocurridos en la capacitación parecen ser responsables de la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal (Revah *et al.*, 2000).

La heparina es un eficaz inductor de la liberación de los espermatozoides *in vitro* (Bosch *et al.*, 2001, Pacey *et al.*, 1995). Por otra parte, una de las características más llamativas de la anatomía vascular del tracto reproductivo femenino en los rumiantes y la especie porcina es la estrecha aposición y el contacto intenso entre los vasos ováricos y uterinos, de tal forma que sustancias reguladoras de bajo peso molecular, tales como las hormonas, pueden pasar de la vena a la arteria y viceversa, sin necesidad de conexiones directas vasculares, de esta manera puede ser establecida, una comunicación bidireccional entre el ovario y el útero.

La existencia de una transmisión local contra corriente de las hormonas gonadales de la vena ovárica a la arteria ovárica ha llevado a la hipótesis de la regulación endocrina por parte del ovario en el ascenso de los espermatozoides al sitio de la fecundación (Hunter, 1996). A través de este mecanismo, relativamente altas concentraciones de hormonas ováricas pueden llegar a la pared del oviducto, en comparación con los niveles sistémicos. Esteroides gonadales pueden coordinar el transporte de gametos en el sitio de la fecundación, cambiando la composición y las propiedades físicas del fluido oviductal y el moco, la tensión de gas, el número de sitios de unión de los espermatozoides y el patrón de actividad contráctil (Hunter 1996).

Mientras que el estrógeno puede aumentar el número de espermatozoides unidos al epitelio del oviducto, la progesterona produce el efecto contrario (Suárez *et al.*, 1991). En el toro, ni el estado hormonal de la hembra, ni la región del oviducto parecen afectar el número de espermatozoides unidos a los explantes oviductales *in vitro* (Lefebvre *et al.*, 1995, Suárez *et al.*, 1991).

El transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino y la penetración espermática en las membranas que rodean los ovocitos dependerán en gran medida de la motilidad espermática. Por otra parte, la motilidad parece ser una condición previa para la fijación de espermatozoides a células del epitelio oviductal (OEC), de tal manera, que espermatozoides muertos no pueden interactuar con OEC (Lefebvre *et al.*, 1997).

Aparentemente los espermatozoides liberados del depósito oviductal tienen más probabilidades de fecundar un ovocito. Tal vez la función básica de almacenamiento de espermatozoides es garantizar el éxito de la unión de los gametos masculino y femenino en el

Revisión bibliográfica

oviducto, mediante el mantenimiento de la viabilidad espermática y su capacidad fecundante (Pollard *et al.*, 1991). El establecimiento de esta reserva parece ser una condición importante para una fecundación exitosa. En las yeguas y otras hembras con celo extenso, el almacenamiento prolongado de espermatozoides en el oviducto es necesario, porque la fecundación puede ocurrir varios días después del apareamiento.

En mamíferos, sólo después de la capacitación, el espermatozoide interactúa con los ovocitos. Al sufrir la reacción acrosómica, quedan expuestos los receptores/ligandos localizados en la membrana acrosomal interna del espermatozoide, los cuales interactúan con los receptores/ligandos del ovocito y sólo entonces, el espermatozoide puede reconocer y penetrar en el ovocito (Thérien *et al.*, 1997).

IV.4.3.2. Capacitación

El espermatozoide testicular es inmóvil e incompetente para fecundar y adquiere la motilidad durante la maduración epididimal y la habilidad fecundante durante la capacitación (Jha, 2003). Este complejo proceso fue descrito por primera vez, de forma independiente, por Austin (1951) y Chang (1951) y comprende una compleja serie de modificaciones moleculares, bioquímicas y ultraestructurales de la membrana plasmática, las cuales ocurren en el tracto reproductivo femenino antes de adquirir la capacidad de fecundar el ovocito. El moco cervical presenta una barrera a los espermatozoides por lo que no pueden nadar correctamente. La presencia de espermatozoides en la vagina estimula la migración de leucocitos, especialmente neutrófilos y macrófagos, en el cuello uterino (Hunter y Wilmut 1983, Pollard *et al.*, 1991).

La capacitación es inducida por la interacción entre glicosaminoglicanos, secretados por el tracto reproductivo de la hembra como la heparina y el plasma seminal, donde proteínas como la PDC-109, se localizan en la superficie del espermatozoide (Reckova 2008). La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol. Es un proceso reversible, que consta de varios pasos y que induce cambios en la superficie de la cabeza del espermatozoide, los cuales son responsables de la reducción de afinidad al epitelio oviductal, a pesar de la atracción producida por la hiperactivación, lo que acelera el desprendimiento de los espermatozoides del epitelio. Esto puede ser explicado por la pérdida de la proteína plasmática al momento de la eyaculación, durante la capacitación inducida por la heparina (Gwathmey *et al.*, 2003). También, durante la capacitación se incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones como el calcio, se presentan cambios en la composición de lípidos de la misma, y un incremento intracelular del pH; igualmente, se presenta una redistribución de las proteínas de la superficie celular, se incrementa la motilidad espermática y la actividad del AMP cíclico, así como también se incrementa la fosforilación de los residuos de tirosina de la proteína (Visconti *et al.*, 2002, Baldi *et al.*, 2002). Estas modificaciones le confieren a los espermatozoides la capacidad de

Revisión bibliográfica

adherirse a la zona pelúcida, completar la reacción acrosómica e iniciar la fusión con el ovocito (Thérien *et al.*, 1998).

La capacitación espermática y una buena motilidad, junto con un acrosoma intacto, se consideraban hasta hace poco las condiciones necesarias para una fecundación exitosa. Sin embargo, estudios recientes han puesto en duda el lugar donde ocurre la reacción acrosómica, indicando que ésta puede ocurrir cuando los espermatozoides atraviesan las células del *cúmulus oophorus*, al menos en el ratón (Jin *et al.*, 2011; Bedford *et al.*, 2011).

El proceso de criopreservación induce cambios en los espermatozoides similares a los que aparecen durante el proceso de capacitación (Cormier *et al.*, 1997).

En el toro, las principales proteínas del plasma seminal (BSP-A1/A2, BSP-A3 y BSP-30-kDa) interactúan específicamente con la heparina y con lipoproteínas de alta densidad (HDL), potenciando la capacitación espermática y estimulando la salida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática. Se conoce además que la salida de los lípidos es dependiente de la concentración de las proteínas BSP y de la duración de la incubación *in vitro*. La pérdida de colesterol de la membrana espermática es un importante paso en el proceso de capacitación (Manjunath *et al.*, 2002; Smith y Yanagimachi, 1990).

Debido a que la capacitación ocurre durante el tránsito del espermatozoide a través del tracto reproductivo de la hembra, se ha propuesto que existen factores en el oviducto que permiten reducir el colesterol contenido en la membrana espermática. Estos estudios muestran que la albúmina y las HDL son aceptores del colesterol y muestran alta concentración en el fluido oviductal. Las HDL probablemente derivadas del plasma son la única clase de lipoproteínas presentes en el fluido folicular y fluido oviductal (Thérien *et al.*, 1997). En las vacas, durante el estro, existe un incremento en la concentración de lipoproteínas de alta densidad en el fluido del oviducto, y se ha propuesto que sirven como posible aceptor del colesterol proveniente del espermatozoide, para promover de esta manera la capacitación y la reacción acrosomal (Chang *et al.*, 1976).

En varias especies se ha demostrado una relación del aumento de la capacitación dependiente de la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas localizadas en el flagelo del espermatozoide (Ecroyd *et al.*, 2004). Esta fosforilación se ha implicado en la aparición de la hiperactivación de la motilidad, una de las características de la capacitación de los espermatozoides (Mahony y Gwathmey, 1999 y Naz y Rajesh 2004), y diferentes fosfoproteínas han sido asociadas con el inicio y mantenimiento de la misma (Tulsian *et al.*, 2007). Adicionalmente contribuye a la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, la reacción acrosómica, la unión espermatozoide-ovocito y su fusión (Urner y Sakkas 2003).

Revisión bibliográfica

Debido que el espermatozoide maduro es una célula altamente especializada, pero no puede sintetizar nuevas proteínas, ni producir su fosforilación por cuenta propia, el principal punto de esta fosforilación durante la capacitación y la fecundación es el flagelo (Kalab *et al.*, 1998). En los toros y otras especies excepto los verracos, parece ser el flagelo la principal parte del espermatozoide en que se presenta fosforilación (Petrunkina *et al.*, 2001 y Asquith, 2004).

Otros reguladores importantes en el proceso de capacitación, como el calcio, el colesterol, el bicarbonato y las especies oxígeno reactivas fueron identificadas por Aitken *et al.*, (1995a).

El sitio exacto donde se inicia el proceso de capacitación, varía entre las especies, según sea el sitio de deposición del semen. En especies como la bovina en el que el semen se deposita en la vagina anterior (Coy *et al.*, 2012), la capacitación comenzará durante la migración de los espermatozoides a través del cuello uterino, pero se completa en el oviducto. Parrish *et al.*, (1989), reportaron que el oviducto produce un potente factor de capacitación, que está presente en el fluido del oviducto. La mayor actividad de este factor se observó en el fluido oviductal recogido en época de celo. En conjunto, estos datos sugieren que la capacitación de espermatozoides en el oviducto está influenciada por los cambios hormonales asociados con el ciclo estral.

En el oviducto, la capacitación reduce la afinidad de unión de los espermatozoides al epitelio oviductal. Como los espermatozoides pierden afinidad por los receptores epiteliales, la hiperactivación podría ayudar a sacarlos del epitelio.

IV.4.3.3. Hiperactivación de la motilidad espermática

Este proceso es vital para la fecundación y está asociado con la fosforilación de la tirosina en el flagelo y se mantiene durante la unión del espermatozoide a la zona pelúcida. Mahony y Gwathmey, (1999), y Maas *et al.*, (1977) reportaron que el aumento repentino del pH de 7.5 a 7.8, en la ovulación, que se mantiene durante toda la fase lútea podría ser el principal factor para inducir la hiperactivación en el oviducto.

En el proceso de hiperactivación los movimientos se inician en la pieza media acompañados por una elevación del Ca^{++} que continúan hasta llegar a la pieza principal (Marquez y Suárez 2007, Cook *et al.*, 1994). La hiperactivación facilita la liberación de los espermatozoides a partir del reservorio del oviducto y los impulsa a través del moco en el lumen del oviducto y la matriz de la granulosa y del *cumulus* (Suárez 2008). Se considera que la hiperactivación es crítica para la fecundación (Stauss *et al.*, 1995) porque permite al espermatozoide desprenderse de la pared del oviducto, nadar en el lumen del oviducto o penetrar las células del *cúmulus oophorus* para alcanzar el ovocito.

Los mecanismos moleculares y las vías de transducción de señal para los procesos de capacitación y reacción acrosómica han sido parcialmente definidos y parecen implicar modificaciones de calcio intracelular y otros iones, transferencia de lípidos y fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides, remodelación de la membrana plasmática, así como cambios en la fosforilación de la proteína (Baldi *et al.*, 2000)

IV.4.3.4. Reacción acrosómica

Es el proceso que ocurre posterior a la capacitación, cuando un espermatozoide se encuentra cerca del sitio de fecundación o entra en contacto con el *cúmulus oophorus*. Es el mayor evento de exocitosis que ocurre en la región apical de la cabeza del espermatozoide, caracterizado por múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que lo rodea, el cual conlleva una serie de cambios morfológicos en la cabeza del espermatozoide (Yanagimachi, 1988) exposición del contenido acrosomal y de su resistente membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994).

Para que se produzca la exocitosis del acrosoma es necesario un incremento en la concentración de Ca^{2+} que es movilizado por los espermatozoides que lo extraen del medio externo y de los depósitos intracelulares (Yanagimachi, 1994)

En la mayoría de las especies, la zona pelúcida (ZP) está rodeada por el *cúmmulus oophorus* y el principal componente de su matriz es el ácido hialurónico. La liberación de hialuronidasa por parte del espermatozoide se ha considerado la causa de la digestión de la matriz del *cúmmulus*. Es posible que los componentes del *cúmmulus* sean los responsables de la iniciación de los primeros estadios de la reacción acrosómica (RA). Yanagimachi (1981) describió que la reacción acrosómica (RA), como se ha demostrado recientemente en el artículo de Jin *et al.*, (2011), realiza dos funciones primordiales: la primera es habilitar al espermatozoide para su pasaje por la zona pelúcida y la segunda ayudar a la fusión del espermatozoide con el ovocito.

En el ratón se asume que los polisacáridos de la ZP3 (ZPC) son los responsables de la unión con el espermatozoide. En vaca y cerda la ZP3 α o ZP4 son las que se unen a espermatozoides (Cánovas *et al.*, 2008). La reacción del acrosoma se produce por la interacción del espermatozoide con glúcidos de la proteína ZP3 de la zona pelúcida. Posterior a la interacción con la ZP3, ocurre la liberación de varias enzimas acrosómicas y otros componentes como glicoproteínas secretadas por el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, que son las enzimas que facilitan la penetración de la zona pelúcida, lo que permite la fusión de la membrana del espermatozoide con el oolema del ovocito.

Revisión bibliográfica

La reacción acrosomal (RA) puede ser inducida *in vitro* en el toro por la exposición a glicosaminoglicanos (GAGs) tales como la heparina (Januskauskas *et al.*, 2000) e igualmente con ionóforos de calcio (como el Hoechst A23187) (Whitfield y Parkinson 1992).

Se han descrito correlaciones significativas entre la respuesta de los espermatozoides a la prueba de inducción *in vitro* de la RA (medida como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado) y la fertilidad de las vacas (medida como las tasas de no retorno al estro a los 60 días post inseminación artificial), incluso a niveles predictivos (Januskauskas *et al.*, 2000)

Bedford *et al.*, (1970) reportó que se pueden producir dos tipos de reacción del acrosoma: a) cuando un estímulo apropiado desencadena una respuesta en espermatozoides previamente capacitados y b) la reacción acrosómica falsa, representada por una pérdida no específica del acrosoma al morir el espermatozoide y en espermatozoides ya muertos. Sin embargo, una proporción de espermatozoides capacitados en libertad puede sufrir la reacción acrosómica falsa y/o, lo que se denomina reacción acrosómica espontánea, antes de llegar al sitio de la fecundación (Talevi y Gualteri (2010), Jin *et al.*, (2011).

IV.4.3.5. Unión y reconocimiento de gametos

La unión del espermatozoide con el ovocito es específica de la especie y dependiente de su zona pelúcida. En la especie humana, el espermatozoide es guiado al ovocito por una combinación de termotaxis y quimiotaxis (Suárez y Pacey, 2006). La acción hidrolítica de glicohidrolasas y proteinasas en el sitio de unión del espermatozoide-zona pelúcida, junto con el impulso generado por una mayor motilidad flagelar del espermatozoide hiperactivado, son factores importantes que regulan el proceso de fecundación (Tulsian y Zeng, 2007).

En la interacción espermatozoide-ovocito, la ZP se une a las proteínas presentes en el acrosoma del espermatozoide ya capacitado, siendo importante la presencia de residuos de azúcares en la ZP para que se dé la interacción (Avilés *et al.*, 1997, 2000, Velásquez *et al.*, 2007). La unión parece ser específicamente a un hidrato de carbono, con receptor glicosilado (Suárez y Pacey 2006, Ghosh y Datta 2003).

El reconocimiento del espermatozoide y el ovocito depende del estado de la escisión de la glicoproteína ZP2 en ratón y la sola unión a la superficie de la zona del espermatozoide no es suficiente para inducir la exocitosis acrosomal (Gahlay *et al.*, 2010).

Cuando se produce la unión de la zona pelúcida con el espermatozoide, éste sufre la reacción acrosómica. La exocitosis acrosomal es esencial para la fecundación y son las glicoproteínas de la ZP las que la promueven (Caballero-Campo *et al.*, 2006), aunque recientemente se ha

demostrado que también puede iniciarse en el *cumulus oophorus* (Jin *et al.*, 2011). En las vacas existe la evidencia que la manosa puede ser el residuo de azúcar específico involucrado en la unión del espermatozoide a la ZP (Yonezawa *et al.*, 2005). El 77% de los carbohidratos de las glicoproteínas de la ZP bovina son cadenas ácidas que contienen ácido siálico y un receptor específico para α -2,3 ácido siálico está presente en la membrana plasmática del espermatozoide. Análisis químicos revelaron que la glicoproteína de la ZP bovina contiene principalmente Neu5Ac (84.5%) y Neu5GC (15.5%), dos tipos de residuos de ácido siálico (Velásquez *et al.*, 2007)

Para explicar la fusión de gametos, se han propuesto las proteínas de anclaje al ovocito, CD9 y glicosilfosfatidil inositol (GPI) y la proteína epididimal en el espermatozoide, como las moléculas candidatas a ser las responsables de la fusión de las membranas del espermatozoide y del ovocito. Sin embargo aún no se han podido analizar claramente las interacciones proteína-proteína en esta fusión. Zhou *et al.*, (2009), demostraron que la proteína CD9, miembro de la superfamilia de proteínas tetraspaninas, presentes en ovocitos maduros de bóvidos, está involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito durante el proceso de fecundación, interviene en la fusión de membranas del ovocito y el espermatozoide, del que se libera una molécula de superficie que parece ser una proteína de 30-100 kDA llamada "oscilina" o factor espermático, que activa al ovocito, produciendo la liberación del Ca^{2+} , almacenado en el espermatozoide, en forma de ondas. Estas ondas se dan periódicamente cada 2-30 minutos dependiendo de la especie y pueden durar varias horas. El inicio de las ondas de Ca^{++} induce la activación del ovocito que termina con la formación de los pronúcleos femenino y masculino y la expulsión del segundo cuerpo polar. Las oscilaciones de Ca^{++} inducen también la exocitosis del contenido enzimático de los gránulos corticales almacenados en la periferia del ovocito, modificando tanto la zona pelúcida como la membrana del ovocito, para prevenir la polispermia. (Olivera *et al.*, 2006). Diversos estudios han reportado proteínas específicas de espermatozoide que interactúan con las proteínas de membrana de ovocitos, estableciendo contacto con un grupo de ligandos candidatos, uno o más de los cuales pueden ser responsables de la inducción de señalización que resulta en la activación de ovocitos y la fusión de los gametos (Pate *et al.*, 2008).

IV.4.3.6. Penetración espermática y fecundación

En cuanto se produce la fusión del espermatozoide y el ovocito, éste se activa, proceso que conlleva a la reanudación de la meiosis (Yanagimachi, 1994). El mecanismo más aceptado de iniciación de la activación es mediado por un factor activador del ovocito, proveniente del acrosoma espermático que es liberado en el ooplasma tras la fusión (Williams, 2002).

Después que los espermatozoides llegan al oviducto, la hiperactivación les permite llegar a los ovocitos y penetrar el medio viscoelástico del *cúmulus* y la zona pelúcida (Figura 6)

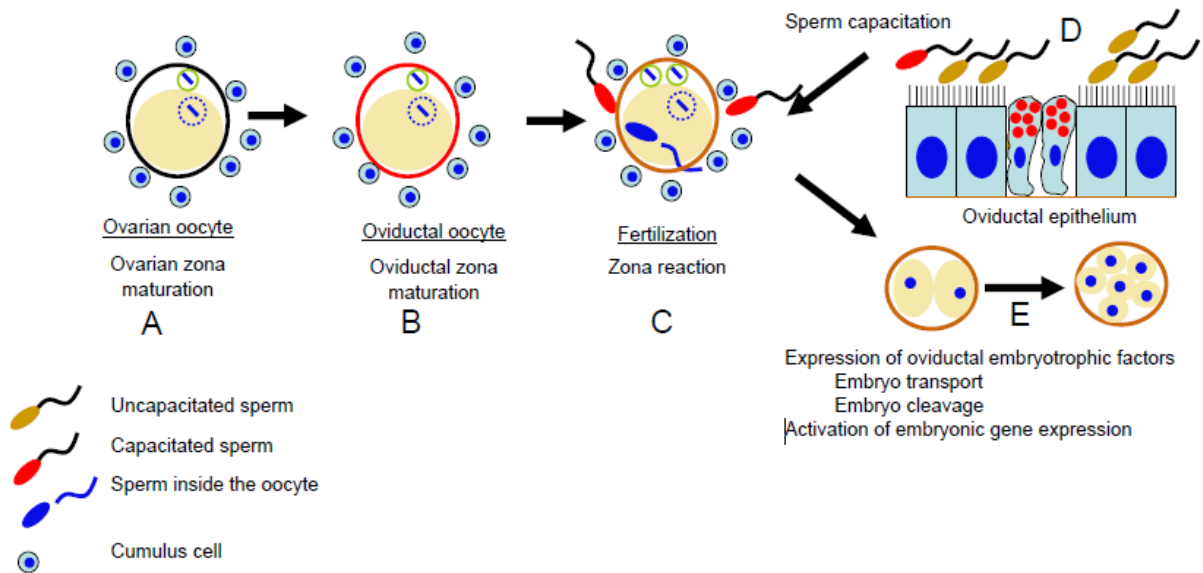


Figura 6. Principales eventos producidos durante la fecundación, en las diferentes regiones anatómicas del oviducto. A. Ovocito en estado metafase II, con células del *cúmulus* expandidas y liberado dentro del infundíbulo oviductal durante la ovulación. B. Una vez en la ampolla oviductal y expuestos al fluido oviductal, los ovocitos son sometidos a maduración oviductal de la ZP. Esta maduración incluye un endurecimiento pre fecundación de la ZP, mediado por glicoproteína del oviducto oviductina (OVGP1), en cerdas y vacas. C. Posteriormente en la unión ampolla-istmo, la ZP endurecida disminuirá las posibilidades de unión y reducirá el número de espermatozoides capaces de penetrar el ovocito. Después de la fecundación, la reacción de zona es activada, evitando la entrada adicional de espermatozoides. D. El Istmo, en la mayoría de las especies es un reservorio de espermatozoides y la región donde el último paso de la capacitación toma lugar. E: El istmo también es la región recorrida por el embrión temprano hacia el útero, y la secreción de factores embriotrópicos oviductales contribuye a este desarrollo fisiológico (Tomado de Avilés *et al.*, 2010. Mol. Hum. Reprod).

Los espermatozoides ya capacitados en su llegada al ámpula oviductal, se contactan con las células del *cumulus oophorus*, constituido por células de la granulosa y una matriz de ácido hialurónico (Virji *et al.*, 1990), el cuál puede ser atravesado por acción de la proteína *hyal 5* con actividad hialuronidasa, de manera que el espermatozoide queda en contacto directo con la ZP (Cánovas y Coy 2008)

La zona pelúcida es la cobertura glicoproteica que rodea el ovocito mamífero, varía en su estructura y grosor de una especie a otra, está conformada por glicoproteínas ZP1 ZP2, ZP3 componentes (ZPA, ZPB, and ZPC). El espermatozoide mamífero se une a cadenas de

Revisión bibliográfica

carbohidratos de glicoproteínas de la ZP en la fase inicial de la fertilización (Yonezawa *et al.*, 2005a) En la especie bovina se ha descrito la participación de residuos de manosa y la implicación del ácido siálico (Velásquez *et al.*, 2007) . En el cerdo y la vaca se evidencia que la ZP3 α o ZP4 (ZPB) se unen al espermatozoide. Posterior a la unión del espermatozoide con el ovocito, la ZP induce la exocitosis del contenido acrosomal, la membrana plasmática del ovocito con el que se fusionan y el citoplasma donde se produce la descondensación del núcleo espermático (Cánovas y Coy 2008)

Cuando el espermatozoide atraviesa la ZP, llega al espacio perivitelino y entra en contacto con el oolema o membrana del ovocito. Varias familias de proteínas como las ADAM (Nishimura *et al.*, 2001), Integrinas (He *et al.*, 2003), CD9 (Zhu *et al.*, 2002), y CRISP1 (Cohen *et al.*, 2000) son responsables de esta fusión.

Posterior a este evento, y debido a la fusión del óvulo y espermatozoide se generan señales que permite el inicio de la transformación del ovocito en embrión (Williams 2002) mediante la activación del ovocito, en el cuál se incrementa el Ca⁺⁺ intracelular, posterior a este evento se reinicia la meiosis II, en el momento que la cromatina del espermatozoide se descondensa en sus citoplasma (Williams 2002). El ovocito sufre un segundo bloqueo durante la meiosis II, y al terminarla expulsa el segundo cuerpo polar y se transforma en célula haploide

El ovocito maduro permanece en metafase II antes de la fertilización debido al factor promotor de maduración (MFP). Después de la fusión esperma-ovocito, el aumento de Ca intracelular produce la inactivación del MFP. El evento cronológicamente siguiente es la descondensación del núcleo espermático en el ovoplasma y la formación de pronúcleos masculino y femenino que migran desde la periferia al centro del ovocito para fusionarse, proceso denominado singamia. Ahora se inicia el desarrollo temprano del embrión, donde el cigoto comienza su desarrollo hacia un organismo multicelular, pasando por el clivaje y la gastrulación. Después de la fertilización, el cigoto se divide por mitosis en blastómeros (Sandler 2000) y se inicia el desarrollo embrionario propiamente dicho.

IV.4.3.7. Reacción cortical y bloqueo de la polispermia

La reacción cortical produce modificaciones bioquímicas y biológicas de la ZP, responsables del bloqueo a la polispermia, llamada reacción de zona (Yanagimachi, 1994; Sun, 2003a., Dean 2004). Estas modificaciones incluyen: resistencia de la ZP a la digestión enzimática, proteólisis de la ZP2 por proteasas y/o remoción de carbohidratos por glicosidasas específicas de los gránulos corticales (Rath *et al.*, 2005).

En los mamíferos, el bloqueo a nivel de la ZP es debido a exocitosis de los gránulos corticales, lo que conlleva a modificaciones en la ZP que provocan que los espermatozoides no se sigan adhiriendo (Yanagimachi, 1994). La fecundación resulta en exocitosis de los gránulos corticales, estructuras derivadas del aparato de Golgi y principales vesículas secretoras del

Revisión bibliográfica

ovocito no fecundado. Son de 0.2 a 0.4 μm de diámetro, se acumulan durante la ovogénesis y no se regeneran, una vez han expulsado su contenido (Wessel, *et al.*, 2001).

De los gránulos corticales se liberan solo un pequeño número de proteínas mayores (de peso molecular (pm) 45 kDa, 34 kDa, 32 kDa, 28 kDa, and 20 kDa, determinadas por SDS-PAGE (Gross *et al.*, 2000), El exudado del espacio perivitelino de toros y porcinos contiene proteasas y proteínas p62 y p56, sobre las cuales no se ha profundizado su estudio, pero al parecer proviene de los gránulos corticales (Hodbohy y Talbot 2001). De igual manera, Muñoz - Gotera *et al.*, (2001) identificaron en mamíferos la calcireticulina, una proteína chaperona de 50 kDa, que se libera después de la exocitosis de los gránulos corticales. Burkart *et al.*, (2012) identificaron la ovastacina, una proteasa de los gránulos corticales del ratón, con capacidad para modificar la zona pelúcida, uniéndose a la ZP2 y previniendo después de la fecundación, la unión del espermatozoide y proporcionando un bloqueo definitivo a la polispermia.

Katsumata *et al.*, (1996) y Amari *et al.*, (2001) demostraron que después de la fecundación uno de los principales cambios en la ZP bovina fue la pérdida de residuos de ácido siálico. En el 2007 Velásquez *et al.*, comprobaron que el ácido siálico y una neuraminidasa están involucrados en la interacción espermatozoide toro y ovocito, tomando parte en el mecanismo de bloqueo a la polispermia. La liberación de una neuraminidasa (sialidasa), contenida en los gránulos corticales del ovocito reduciría el contenido de ácido siálico de la ZP, por digestión del mismo, seguido de la activación del ovocito (exocitosis de los gránulos corticales) produciendo el bloqueo a la polispermia.

Tradicionalmente dos modelos han sido propuestos, para explicar el bloqueo a la polispermia en mamíferos, el primero basado en el oviducto, evitando la llegada masiva de espermatozoides a las proximidades del ovocito (Yanagimachi, 1994) y el segundo basado en el ovocito, lo que incluye cambios en la membrana y ZP, como reacción a la penetración del espermatozoide, mecanismo conocido como “reacción de zona”, que involucra exocitosis de los gránulos corticales (GC) al espacio perivitelino, debido a las oscilaciones de Ca^{2+} producidas durante la penetración, e inducidas por el esperma fertilizado. Como parte del proceso de reacción cortical (Coy y Avilés 2010), glicosidasas específicas y proteasas presentes en los GC remueven carbohidratos involucrados en la unión esperma-ZP.

Coy *et al.*, (2008a) determinaron la existencia de un nuevo mecanismo de prevención de la polispermia, antes que el ovocito interactúe con el espermatozoide: el “endurecimiento de la ZP pre-fecundación”, en cerdas y vacas, el cual mejora la producción de embriones *in vitro* en cerdas (Cánovas 2009).

Mediante análisis proteómicos, estos autores lograron el aislamiento y la identificación de una glicoproteína específica del oviducto (OVGP1), con dos bandas de 95kDa y 75kDa, secretada por las células oviductales en el periodo de ovulación (Avilés *et al.*, 2010), que se unen a la

Revisión bibliográfica

ZP porcina y bovina. Coy *et al.*, (2008b), demostraron que la mencionada glicoproteína oviductal (OVGP1), identificada en el fluido oviductal, denominada “Oviductina”, es la responsable de un mecanismo adicional de control a la polispermia en ungulados, diferente del dependiente de la exocitosis de los gránulos corticales. Esta glicoproteína, es la responsable de incrementar la resistencia de la ZP del ovocito recién ovulado a la proteólisis y penetración espermática, y está regulada por estrógenos. Esta glicoproteína actúa en asociación con glicosaminoglicanos (GAGs) como la heparina, estabilizando el efecto de endurecimiento. Este complejo produce los mencionados cambios en la zona pelúcida antes de la fecundación, afectando la interacción espermatozoide-ovocito. Este importante hallazgo determinó que las propiedades bioquímicas y biológicas de la zona pelúcida son modificadas por secreciones oviductales, durante su tránsito por el oviducto a lo largo de la ampolla, donde recién se ha liberado el ovocito. Lo que ratifica la apreciación de que la maduración de la ZP en el oviducto es necesaria para adquirir la insensibilidad a proteinasas, y la habilidad de seleccionar el espermatozoide que va a entrar. Esto indica claramente que el oviducto selecciona subpoblaciones específicas de espermatozoides (Rath *et al.*, 2008).

Este proceso es reversible y adicional a los modelos ya conocidos para el control de la polispermia en ungulados, ya que una vez ocurrida la fecundación y activado el bloqueo de la polispermia, este factor es parcial y lentamente removido de la zona pelúcida, durante su tránsito a través del útero e incorporado a través del espacio perivitelino a la membrana plasmática (Coy *et al.*, 2008b). Posteriormente, si el ovocito es fecundado, la entrada del espermatozoide dentro del ooplasma induce la liberación del contenido de los gránulos corticales y se completa el bloqueo a la polispermia. (Figura 7)

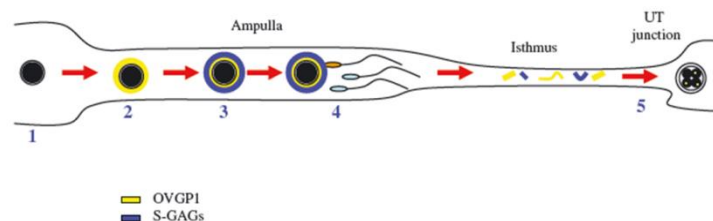


Figura 7. Descripción del mecanismo pre fertilización propuesto para prevención de la polispermia en ungulados. Cuando el ovocito es depositado en la ampolla, (1) poco después de la ovulación, la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1) lo rodea en una cubierta que es responsable de la resistencia de la zona pelúcida (ZP) a la proteólisis. (2) Glicosaminoglicanos como la heparina (GAGs) en el fluido oviductal estabilizan y refuerzan la unión de OVGP1 con la ZP (3) afectando esta interacción con el espermatozoide seleccionado. (4) Durante la transición del ovocito fecundado al útero, el sistema es desestabilizado y la OVGP1 es parcialmente separada o absorbida dentro del ovocito. Tomado de Coy y Avilés Biol. Rev. (2010).

IV.4.4. PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES

La producción de embriones *in vitro* es un procedimiento que consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar los resultados finales del proceso. Desde el nacimiento del primer ternero producto de la fecundación *in vitro* (FIV) (Brackett *et al.*, 1982) y la aplicación de esta tecnología en forma exitosa a programas comerciales de mejoramiento genético, la investigación en las últimas décadas reporta que el proceso de producción *in vitro* de embriones sigue siendo ineficiente. Aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros sometidos a maduración nuclear *in vitro* evolucionan de profase I a metafase II (Watson 2000, Mucci *et al.*, 2006), el estado en el que normalmente son ovulados *in vivo*, y cerca del 80 % sometido a maduración y fecundación llega a estado de 2 células en 24-48 horas en la especie bovina (Lonergan *et al.*, 2003a, Payton *et al.*, 2004). Sin embargo, sólo del 29% al 40% llegan a alcanzar la etapa de blastocisto el día 7 a 8 después de la fecundación (Rizos *et al.*, 2008, Payton *et al.*, 2004, Lonergan *et al.*, 2003b), frente al 70% *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002)

Comparativamente, los embriones producidos *in vivo* son más competentes para alcanzar su desarrollo que los madurados *in vitro*, los cuáles son de menor calidad. La mayor parte de las fallas de los procedimientos *in vitro* ocurren en el final de la pre-implantación, del estado de cigoto a blastocisto. (Greeve *et al.*, 1987).

La calidad intrínseca de los ovocitos es el factor principal que afecta los rendimientos del proceso, mientras que las condiciones de fecundación y cultivo de los embriones tienen un papel crucial en determinar la calidad del blastocisto (Holm *et al.*, 2002), e influyen en la resistencia a la criopreservación, independientemente del cigoto (Rizos *et al.*, 2002b). El medio ambiente del cultivo es crítico para la determinación de la calidad de los ovocitos, medido en términos de criotolerancia. En producción *in vitro*, se presenta el síndrome de ternero gigante, por una alteración de la expresión genética, fenómeno adjudicado en gran parte al efecto del suero fetal bovino en los medios. Es claro que el medio ambiente del cultivo post-fecundación tiene efecto sobre la transcripción de genes y la alteración en los medios, aunque sea por efecto de un día, pueden alterar la expresión genética (Lonergan *et al.*, 2003b)

Los embriones producidos *in vivo* difieren de los producidos *in vitro* en importantes aspectos (Herradón *et al.*, 2007). Los *in vitro* presentan citoplasma más oscuro por mayor contenido de lípidos como triglicéridos y menos lípidos de otras clases, zona pelúcida más frágil, mayor sensibilidad térmica, mayor incidencia de anomalías cromosómicas, espacio perivitelino más amplio, vacuolas en el trofoblasto, una escasa población de las microvellosidades, reducidas conexiones intercelulares (Rizos *et al.*, 2002b), diferencias en la comunicación intercelular (Boni *et al.*, 1999), alteraciones cromosómicas (Rizos *et al.*, 2003), y mayor velocidad de desarrollo (Lonergan *et al.*, 1999), factores que pueden contribuir a una mayor sensibilidad a la criolesión exhibida por dichos embriones (Rizos *et al.*, 2002b). En la maduración *in vivo*, la expansión del *cumulus* suele ser más extensa y a nivel ultra estructural hay un alto grado de

Revisión bibliográfica

homogeneidad entre los ovocitos madurados *in vivo*, vs. la heterogeneidad ultra estructural exhibida en los madurados *in vitro*, incluso cuando una población uniforme se seleccione antes de la maduración *in vitro* (IVM). La maduración *in vitro* ha demostrado resultar en desviaciones que van desde asincronías nucleares, citoplasmáticas y la maduración del *cúmulus*, a la degeneración absoluta.

Stinshoff *et al.*, (2012), demostraron que la adición de proteínas al plasma seminal no afecta ni la división, ni las tasas de desarrollo embrionario en proceso *in vitro* de producción de embriones, ni la expresión de ARN mensajero.

Para la producción *in vitro* de embriones son necesarios una serie de pasos que se describen a continuación.

IV.4.4.1. Obtención y selección de ovocitos

Los ovocitos se pueden obtener de animales vivos o post-mortem. Post-mortem, a partir de hembras sacrificadas, mediante la extracción de sus ovarios y aspiración o corte de los folículos de un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm de diámetro. La aspiración de estos folículos se realiza con aguja de 18-g. El método de corte o *slicing* (Suss y Madison 1983), permite obtener mayor número de ovocitos por ovario, 63.3/22.1 corte/aspiración (Hamano y Kuwayama, 1993). Los folículos menores de 2 mm, ubicados en la región subcortical, deben descartarse ya que contienen ovocitos menos competentes en la producción de embriones que los corticales, por su menor potencial para maduración (Arlotto *et al.*, 1996). Los ovocitos extraídos por cualquier método proceden de folículos en diversos estados de desarrollo, por lo que no es fácil conseguir una población homogénea de sólo ovocitos competentes.

In vivo, los ovocitos se pueden obtener por aspiración trans-vaginal guiada por ultrasonido (OPU), durante cualquier etapa del ciclo estral, e incluso en los primeros 90 días de gestación.

El origen de los ovocitos es un factor determinante en el éxito de la fecundación, división y producción de blastocistos. Greve *et al.*, (1987) determinaron que ovocitos provenientes de grandes folículos son más competentes que los obtenidos de pequeños folículos (Pavlok *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994). En procesos de fecundación *in vitro* en bóvidos está claro que la calidad intrínseca de los ovocitos es el factor clave que determina la calidad del blastocisto (Rizos *et al.*, 2002b). Sin embargo el macho empleado también puede tener influencia sobre la proporción de ovocitos que llegan a blastocisto (Comizzoli *et al.*, 2003)

Existen varios criterios para la selección de los ovocitos. Uno de ellos es según las estructuras que lo componen: Los principales criterios para diferenciar ovocitos competentes e incompetentes para desarrollo embrionario son la morfología del citoplasma y células del

Revisión bibliográfica

cumulus ya que estas últimas son las que le van a proveer nutrientes al ovocito durante su crecimiento, y participan en la síntesis del ácido hialurónico y proteínas que juegan un papel importante en el transporte del ovocito por el oviducto y en su encuentro con el espermatozoide al momento de la fecundación. Además de estos, también se evalúan los siguientes aspectos:

- Morfología del ovario-diámetro folicular: Se determina por observación de la cantidad de folículos de más de 2.5 mm de diámetro hasta 10mm de diámetro, clasificando como los mejores para extraer ovocitos los que presentan mayor número de folículos de los tamaños mencionados, ya que estos presentan mayores tasas de maduración y formación de blastocistos (Gandolfi *et al.*, 1987).
- Aspecto del ooplasma. para Nagano *et al.*, (2006), el citoplasma que ha mostrado mejores resultados en producción *in vitro* de embriones es el de color oscuro, por la presencia de lípidos.
- Morfología del complejo *cumulus*-ovocito (CCOs): Este debe ser compacto, homogéneo y formado por al menos 4 capas de células. Estos son los que presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos ya que los ovocitos procedentes de folículos de reducido tamaño (<2mm), aunque pueden madurar nuclearmente, son citoplasmáticamente inmaduros (Stojkovic *et al.*, 2001).
- Diámetro del ovocito: éste condiciona su capacidad para madurar (Fair *et al.*, 1995) de tal forma que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110 μm se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aún la capacidad para madurar adecuadamente. Este es el tamaño mínimo que deben tener para reiniciar la meiosis (Sato *et al.*, 1990). Diversos trabajos han determinado que existe una relación directa entre el diámetro de los ovocitos bovinos y su competencia para el desarrollo desde la maduración meiótica, pasando por fecundación y desarrollo embrionario. Estos porcentajes aumentan a medida que incrementa el diámetro del ovocito sometido a maduración *in vitro*. Incluso la penetración polispérmica fue mayor en ovocitos menores de 115 μm (Otoi *et al.*, 1997).

IV.4.4.2. Maduración *in vitro* (MIV)

La maduración *in vitro* de los ovocitos, al igual que *in vivo*, requiere el reinicio de la meiosis y alcanzar el estado de metafase II. La maduración completa involucra la maduración nuclear y maduración citoplasmática. *In vitro*, la maduración nuclear se induce espontáneamente cuando los ovocitos salen del folículo donde estuvieron almacenados en un ambiente inhibitorio, y son llevados a un medio de cultivo semejante al ambiente que encontrarían en el

Revisión bibliográfica

oviducto, donde se produce la ruptura de la vesícula germinal y expulsión del corpúsculo polar (Gordon, 1994). Sin embargo *in vitro*, se presentan deficiencias, aparentemente debidas a que la maduración citoplasmática es incompleta (Pavlok *et al.*, 1992), y de ahí en adelante se hacen deficientes los procesos de fecundación y desarrollo embrionario, cuando son comparados con los procesos *in vivo*.

- Medios de cultivo empleados para MIV

La correcta elaboración de los medios de cultivo para maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* es definitiva para lograr el éxito del proceso. Algunos parámetros en las condiciones de cultivo son prioritarios para lograr este éxito tales como:

- ❖ Presión osmótica: 245 mOsm/Kg a 280 mOsm/Kg (Duque *et al.*, 2003b)
- ❖ pH: neutro- ligeramente alcalino, 7.2-7.6 (Mucci *et al.*, 2006)
- ❖ Fase gaseosa: El CO₂ actúa como regulador del pH junto con el bicarbonato en los medios. Un valor apropiado es del 5%. El ovocito requiere condiciones anaerobias.
- ❖ Agua: con alto grado de pureza porque el medio de maduración contiene fuentes proteicas que fijarían los metales pesados en agua de regular calidad y éstos alterarían los procesos reproductivos. Los mejores resultados se han obtenido con agua proveniente de los sistemas de ósmosis reversa en un rango de 18.3 mega-ohms/cm a 25 °C
- ❖ Temperatura: equivalente a la corporal 38.5°C-39°C, ya que incrementos en la temperatura (41°C) alteran la fisiología del ovocito y ocasionan alteraciones en los gránulos corticales en el estado GV y alteran la función del *cumulus*, reduciendo la producción de ácido hialurónico y la habilidad para sufrir maduración nuclear y desarrollo embrionario.

En la actualidad se emplean varios medios para los procesos de maduración *in vitro*. Uno de ellos es el medio de cultivo tisular TCM-199, compuesto por solución salina de Earle's, glutamina, bicarbonato, Hepes, y suplementado con suero de origen animal (10%) y gonadotropinas, en las condiciones ya mencionadas. También se emplean medio de fluido oviductal humano (mHTF) modificado, compuesto por solución salina, piruvato, lactato, glucosa y albúmina como fuentes de energía y el medio fluido oviductal sintético (mSOF).

Los factores de crecimiento surgieron durante la década de los 80 para contrarrestar el bloqueo de desarrollo en estado de 8 a 16 células. La mezcla de factores de crecimiento que existen en el suero sigue siendo un promotor poderoso del desarrollo del embrión *in vitro*, pero su constitución no uniforme, puede ocasionar efectos adversos sobre la morfología embrionaria (Thompson, 2000).

Los medios para maduración *in vitro* están compuestos por diversas sustancias que serán discutidas en este capítulo. La adición a los medios de maduración de cisteína (mejora la producción de blastocistos), glutamina, gonadotropinas hipofisarias (LH mejora la calidad

Revisión bibliográfica

ovocitaria y FSH favorece la maduración y desarrollo embrionario) o placentarias, como reguladoras de la maduración nuclear, factores de crecimiento, como insulina, activina, hormona de crecimiento, factor epidermal de crecimiento (EGF) que ayudan a la reactivación de la meiosis, fluido folicular o la presencia de células del *cumulus*, entre otros, contribuyen a mejorar el proceso de maduración (Sun y Nagai 2003). Antioxidantes como el ácido retinoico también mejoran la maduración y desarrollo embrionario (Duque *et al.*, 2003a).

Las principales sustancias empleadas para suplementación proteica en medios para MIV son la albúmina sérica bovina (BSA) y el suero de origen animal, como *fetal bovine serum* (FBS), *fetal calf serum* (FCS), suero de macho castrado (SS) y suero de vaca en celo (ECS), entre otros, que contribuyen a la maduración tanto nuclear como citoplasmática por su composición con proteínas (albúmina), ácidos grasos, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento. El suero actúa como fuente de albúmina que equilibra la osmolaridad y elimina fuentes de radicales libres de oxígeno. Estos sueros de origen bovino no tienen composición definida, ya que la misma depende de las condiciones fisiológicas y de salud que presente el animal al momento de ser extraído, por lo que varían de un lote a otro, incluso pueden presentar contenidos tóxicos al cultivo celular. Por ello su uso genera controversia y se plantea la sustitución de estas moléculas por otras proteicas de naturaleza químicamente definida, como el PVP con un peso molecular de 40.000 KDa (PVP-40) que ha mostrado mejores resultados de ovocitos madurados y mayor división comparado con FBS (Fukui *et al.*, 2000).

Ruibal *et al.*, (2006), en estudios con fluido oviductal sintético (SOFm) reemplazando el TCM-199 obtuvieron resultados similares. De igual manera, reportaron aceptables resultados de MIV, en un medio libre de proteínas, cultivado con bajo contenido en oxígeno ya que *in vivo*, en los folículos ováricos oviducto y útero, los niveles de oxígeno oscilan entre el 1.5 y el 8 % (Harvey, 2007).

La adición de gonadotropinas al medio incrementa el número de ovocitos que reinician la meiosis y la obtención de embriones viables (Liu *et al.*, 1997)

Existen estudios contradictorios frente al uso de estrógenos. Recientes observaciones indican que los estrógenos afectan negativamente a la maduración nuclear de los ovocitos bovinos (Beker *et al.*, 2002) provocando una disminución de la proporción de ovocitos que alcanzan la metafase II y de blastocistos obtenidos, al tiempo que incrementan la frecuencia de anomalías nucleares. Sin embargo, la presencia de suero y FSH en el medio neutraliza el efecto negativo de los estrógenos (Beker *et al.*, 2002), lo que podría explicar la dificultad para observar estos efectos adversos.

El líquido folicular obtenido de folículos mayores de 4 mm no atrésicos para suplementar el medio TCM-199 mejora la maduración de ovocitos, incrementando la formación de pronúcleos masculinos.

Revisión bibliográfica

El ovocito de la vaca requiere para su maduración, en un medio adecuado, un período de 24 horas a 38.5-39 °C, con atmósfera de CO₂ al 5% y humedad relativa del 95% (Thompson 2000).

El procedimiento descrito por Fukui y Ono (1989), consistente en cultivar durante 24 horas los ovocitos inmaduros de vaca en TCM-199 suplementado con un 10% de suero fetal (FBS) inactivado por calor, hormonas y gonadotropinas (FSH y LH), a una temperatura de 38.5° C, en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire, humedad relativa de 95-100%, con una osmolaridad de los medios de 290m Osm y pH en los medios de 7,4, ha sido uno de los más empleados.

Uno de los principales problemas en los medios es la formación de moléculas de oxígeno reactivo (ROS), que produce efectos negativos durante la maduración, desarrollo, metabolismo y la expresión génica de los embriones (Ruibal *et al.*, 2006)

Algunos estudios recientes han analizado el efecto de la MIV en bajas tensiones de oxígeno, pero los resultados son contradictorios observándose mejoras en el porcentaje de blastocistos (Karja *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2005), ausencia de diferencias (Iwamoto *et al.*, 2005) o efectos desfavorables (Oyamada y Fukui 2004).

Existen algunas sustancias que permiten direccionar los resultados en los medios de maduración, como la roscovitina, que mantiene el arresto meiótico (Coy *et al.*, 2005) el piruvato sódico que promueve la maduración nuclear, o el β-mercaptoetanol, que protege frente al stress oxidativo como.

Los ovocitos inmaduros se identifican porque presentan la membrana ooplasmática adosada a la cara interna de la zona pelúcida, la vesícula germinal (GV) prominente y no se observa el primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino.

Existen varios métodos de valoración de la maduración. La medición de los niveles de glutatión intracelular (GSH), principal agente antioxidante no enzimático y la capacidad del citoplasma para descondensar el espermatozoide o inducir formación del pronúcleo masculino se pueden emplear como índice para valorar la maduración citoplasmática (Coy y Romar 2002). Otros métodos consisten en la valoración de la morfología nuclear, mediante tinción, que requiere denudación de las células del *cumulus* y fijación, como paso previo a la tinción. Comúnmente, se emplean Lacmoid y bisbenzimidina (Hoechst 33342) fluorocromo específico para ADN que permite visualizar la cromatina bajo luz ultravioleta, con longitud de onda de 365 nm, filtro de fluorescencia y objetivo de 200x y 400x.

Se consideran como no maduros los ovocitos que presentan la vesícula germinal o metafase I, sin expulsión del primer corpúsculo polar en el espacio perivitelino. Existe otro método de valoración de la maduración, por determinación de la expansión de las capas del *cúmmulus* originada por el ácido hialurónico. Hunter y Moor, (1987) clasifican en grado 1 ovocito maduro, por completa expansión (300µm o más), grado 2, moderada expansión (200-300 µm) y grado 3 o no maduro, a la poca expansión, ya que están aún adheridas a la zona pelúcida.

IV.4.4.3. Fecundación *in vitro* (FIV)

El protocolo más frecuentemente empleado es el descrito por Parrish *et al.* (1988) que emplea medio FIV-Talp suplementado con BSA, piruvato de sodio, heparina, PHE (penicilamina, hipotaurina y epinefrina) y antibiótico. Para realizar la fecundación *in vitro*, ya deben estar capacitados *in vitro* los espermatozoides. Varias técnicas se emplean para la selección y separación de espermatozoides móviles, que a su vez mejoran la motilidad, favorecen la remoción de proteínas y factores decapacitantes e incrementan el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, como el método de Percoll, *Swim-up*, y gradientes de albúmina.

EL método en gradiente discontinuo de Percoll (45%-90%) por centrifugación (Parrish *et al.*, 1995), compuesto de partículas de sílice coloidal y recubierto con polivinilpirrolidona (PVP), separa los espermatozoides viables, incrementa el porcentaje de motilidad espermática total y progresiva, la frecuencia de batido, la motilidad rectilínea, la linealidad y las células de rápido movimiento. Además, el porcentaje de células con membrana plasmática intacta y el potencial de membrana mitocondrial se incrementó en las muestras posterior a la centrifugación (Suzuki *et al.*, 2002). Sin embargo, Oliveira *et al.* (2012) reportaron incremento en el daño a la membrana acrosómica con este método.

El método de *Swim up*, de migración espermática para selección de espermatozoides con alta motilidad (Parrish *et al.*, 1995) que llegan a la superficie del medio después de la incubación, logra una baja tasa de recuperación de espermatozoides, por lo que es preferible emplearlo en muestras de semen con elevada concentración de espermatozoides con buena motilidad y sin riesgo de toxicidad.

Morales *et al.* (1991) compararon los métodos de Percoll y *Swim-up*, encontrando que con el Percoll se obtiene mayor cantidad de espermatozoides recuperados que con el *Swim-up*, ($p < 0.001$), posiblemente por la fuerza centrífuga aplicada a la preparación. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células móviles o espermatozoides con reacción acrosomal.

Revisión bibliográfica

Los glicosaminoglicanos, como heparina, en el medio, favorecen la capacitación espermática y la reacción acrosómica *in vitro*, porque ayudan a remover componentes del plasma seminal ubicados en la superficie espermática (Gordon *et al.*, 1994).

Cumplido el período de 24 horas de maduración *in vitro* (MIV) y con los espermatozoides ya capacitados, se inicia el cocultivo de los complejo *cumulus oophorus* (CCOs) con los espermatozoides, a una concentración de 500.000-2.000.000 espermatozoides/mL (Ward *et al.*, 2000), previa determinación de la capacitación espermática, evaluando la motilidad progresiva individual y la concentración espermática (Lu y Seidel 2004).

El cocultivo de los ovocitos con los espermatozoides no debe ser por un tiempo mayor a 18 horas, a temperatura de 38.5 °C-39°C, equilibrado con 5% CO₂ en 100% de humedad relativa. El tiempo no debe ser muy prolongado ya que se puede incrementar la producción de radicales libres de oxígeno y aumentar las tasas de polispermia. La relación de volumen empleada entre medio de cultivo FIV y ovocitos es de 1:10.

Medios como el *Tyrode Albumine Lactate Piruvate*-TALP (Parrish *et al.*, 1988) o el TCM-199, suplementados con BSA, cafeína y heparina o cultivos celulares con células del *cumulus* o células oviductales son los más empleados. Factores inherentes al medio como la osmolaridad y pH son determinantes en las tasas de desarrollo alcanzadas (Yoon *et al.*, 2000).

El compuesto de penicilamina, hipotaurina y epinefrina (PHE) es empleado en este proceso, adicionándolo al medio, por sus efectos benéficos sobre los resultados obtenidos ya que actúa como antioxidante sobre el medio, estimula la capacitación espermática, aumenta la motilidad, penetración de ovocitos y reacción acrosómica (Andrews *et al.*, 1989).

Posterior a la fecundación *in vitro*, se libera el segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino y se forman los pronúcleos femenino y masculino.

Existen varios protocolos para valoración de procesos de FIV. Para embriones tempranos se emplea ácido acético-etanol (1:3) como fijador por 24 horas y tinción con acetato-orceína o Lacmoid. Otra opción es la fijación en glutaraldehído al 0,5% y coloración fluorescente del núcleo con bisbenzimidina-Hoechst 33342, como se trató en valoración de MIV.

Como evidencia de fecundación se tienen en cuenta los siguientes criterios: Formación de dos pronúcleos, cabeza compacta o descondensada del espermatozoide en el ooplasma con presencia de un pronúcleo, segundo cuerpo polar en el espacio perivitelino, o porcentaje de embriones de 2-4 células.

IV.4.4.4. Cultivo y desarrollo embrionario *in vitro*

Varios factores son importantes en la calidad del blastocisto, pero el medio ambiente post fecundación del cultivo es el factor determinante, y más aún si se tiene cuenta que en la producción *in vitro* es más frecuente la apoptosis que en embriones *in vivo* (Gjorret *et al.*, 2001)

En la transición de cigoto a blastocisto, en el cultivo post-fecundación, se producen varios acontecimientos importantes de desarrollo que determinarán la calidad del blastocisto, tales como división, que se sabe es crítico en la determinación el desarrollo posterior del embrión (Lonergan *et al.*, 1999), activación del genoma embrionario en la etapa de 8 a 16 células (Memili y First 2000), la compactación de la mórula, y la formación del blastocisto en los días 6-7, con la diferenciación de los dos tipos de células, el trofoectodermo y la masa celular interna. Cualquier modificación del cultivo o el ambiente del cultivo en cualquiera de las etapas pueden afectar drásticamente al embrión (Rizos *et al.*, 2008).

Después de la fecundación, el desarrollo embrionario temprano depende del mRNA que fue transcrito durante el crecimiento del ovocito y sólo después (en estado de 8-16 células en bóvidos) El genoma del embrión es activado y toma el control sobre su propio destino. Durante los días 1 a 6, el embrión de vaca sufre importantes eventos en la transformación del estado de cigoto a blastocisto; esto incluye la primera división y este tiempo es de crítica importancia para determinar el subsecuente desarrollo del embrión.

Ya se ha mencionado la importancia de la calidad del ovocito como el principal factor que afecta la proporción de desarrollo de ovocitos inmaduros a blastocistos y que el cultivo medio ambiental afecta la post-fecundación, en cuanto a la calidad de los blastocistos medida en términos de criotolerancia y transcripción. Diversos estudios han demostrado que simplemente omitiendo el suero del medio de cultivo durante el período de post-fecundación se produce un efecto positivo en criotolerancia, el cual se reflejó en cambios en relativa abundancia del mRNA importante en el desarrollo de los genes (Lonergan *et al.*, 2003b).

Wrenzycki *et al.* (1996) demostraron que las diferencias observadas en la calidad de blastocistos producidos *in vitro* e *in vivo* radican en la expresión del gen de la conexina 43. Este gen está implicado en la formación de una proteína que da lugar a uniones entre las células. Además, el desarrollo acelerado *in vitro* debido al suero (Lonergan *et al.*, 1999) puede afectar la regulación génica y la transcripción, que resulta en alteraciones del desarrollo adecuado, como el gran tamaño del feto en las especies bovinas (Young *et al.*, 1998).

Rizos *et al.* (2008) reportan varios factores que influyen en la proporción de sexos en el ganado fruto de tecnologías reproductivas, tales como: el momento de la inseminación *in vivo*, el estado de maduración del ovocito en el momento de la inseminación *in vitro*, la duración de

Revisión bibliográfica

la coincubación de los gametos *in vitro* y el período posterior a las condiciones de cultivo de fecundación *in vitro*.

El embrión macho en la pre-implantación se desarrolla más rápidamente que el embrión de sexo femenino. Nedambale *et al.* (2004) encontraron que los embriones de PIV que llegaron a estadio de blastocisto temprano eran predominantemente machos y mostraron una mejor morfología y soportaron la vitrificación en mayor proporción que los blastocitos femeninos. Se sugiere que en el cultivo *in vitro* de la especie bovina, la glucosa acelera el desarrollo de machos y frena el desarrollo de hembras (Kochhar, *et al.*, 2001)

Los componentes orgánicos y condiciones físicas de los mismos en el medio de cultivo son definitivos para alcanzar un exitoso desarrollo embrionario (Palasz 1996). En los medios para desarrollo embrionario se emplean como fuentes de energía lactato, piruvato y glutamina, en estados iniciales del desarrollo embrionario, antes de la activación del genoma (Palasz 1996). La glucosa no es utilizada en estos estadios, por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa (Gardner y Lane 1998), por lo que generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario. Ya en el estadio 8-16 células, aumenta la demanda del embrión por la glucosa (Thompson, 2000). Durante el progreso de la compactación y blastulación este bloqueo es removido y la glucosa contribuye a incrementar la producción de ATP vía oxidación. La demanda de ATP aumenta a medida que la compactación y blastulación avanzan, además la producción de la glucólisis también aumenta con el desarrollo, provocando un aumento significativo del consumo de la glucosa. Por lo tanto, los medios de cultivo deben ser diseñados para suprimir glucólisis durante el desarrollo pre-compactación y luego activarla durante el desarrollo después de la compactación.

Varios estudios han demostrado que cuando las concentraciones de glucosa *in vitro* son más altas que *in vivo*, el desarrollo embrionario temprano se retrasa o incluso se bloquea (Thompson *et al.*, 1992a). Otros estudios reportan su uso como crítico para la meiosis, por lo que debe estar en niveles máximos de 10 mM para que no se convierta en una limitante del desarrollo embrionario (Ruibal *et al.*, 2006), y aunque la glucosa no hace un mayor aporte de ATP a los requerimientos energéticos durante el desarrollo de la pre-implantación, sí intervienen en la regulación de la expresión de enzimas y proteínas, algunas de ellas con actividad transportadora ubicadas en membrana celular (Jansen *et al.*, 2006).

En cuanto a las proteínas, los aminoácidos son añadidos a los medios de cultivo y actúan como tampón intracelular. Los aminoácidos no esenciales favorecen el desarrollo temprano del embrión y los esenciales actúan sobre el desarrollo en embriones mayores de 8 células (Van Winkle, 2001).

La albúmina es una de las proteínas más abundantes del fluido oviductal, junto con la inmunoglobulina G y se adiciona a los medios en productos como el BSA, los cuales ejercen

Revisión bibliográfica

efectos benéficos junto con suero de origen animal, como el suero fetal bovino (FBS) o suero de vaca en celo (SVC). Los sueros actúan como protección ante sustancias tóxicas, adicionando factores de crecimiento y reduciendo la tensión superficial del medio evitando adherencia de los embriones; adicionalmente le proveen al ovocito nitrógeno de origen proteico.

Existen polímeros sintéticos que pueden reemplazar el suero, como Polivinilalcohol (PVA) y polivinilpirrolidona (PVP) (Gardner y Lane 1998), aunque presentan menor tasa de producción embrionaria y menor porcentaje de gestación. Dentro de su composición aunque variable en su concentración, el suero fetal bovino presenta albúmina, globulina, urea, glucosa, potasio, sodio y fósforo (Palasz, 1996). El suero más empleado es el FBS, debido a su actividad embriotrónica, contenido de glucosa 6 veces superior que en el suero de toro adulto y 85% más de proteína que el de animales adultos (Hammond, 2000)

Como hemos comentado, la adición de suero a los medios genera controversia, pero se ha determinado que estimula el desarrollo de mórulas y blastocistos, acelera el desarrollo embrionario (Holm *et al.*, 2002; Fouladi-Nashta *et al.*, 2005) y mejora la tasa de eclosión y producción (Gómez 2000), pero también se han atribuido efectos negativos, como alteraciones mitocondriales, excesiva producción de lactato y alargamiento del período de gestación (*large offspring síndrome*) (Farin y Crosier 2001). Actualmente existen en el mercado compuestos comerciales formulados para reemplazar el uso de los tan controvertidos sueros.

Al reemplazar la albúmina por PVA, los embriones resultan metabólicamente comprometidos, por lo que el papel nutritivo de la albúmina es importante. El PVA proporciona una actividad surfactante similar a la albúmina. Sin embargo, la albúmina es la proteína más frecuente del tracto reproductivo en los mamíferos con funciones intracelulares y de apoyo extracelular. En la mayoría de trabajos, tanto el desarrollo *in vitro* como el contenido proteico en los blastocistos, es más bajo cuando se reemplaza la albúmina por el PVA, en comparación con los producidos *in vivo* o en medio de cultivo suplementado con BSA o suero fetal bovino.

Durante la división temprana, la degradación de proteínas es superior a la síntesis de proteínas. Es evidente que los blastocistos derivados del medio suplementado con PVA tienen un perfil metabólico alterado en comparación con los cultivados en la presencia de la albúmina y los derivados *in vivo* (Thompson *et al.*, 2000).

Thompson *et al.* (2000) postularon que el EDTA secuestra los efectos tóxicos de la contaminación de los cationes de metales pesados, probablemente por inhibir la producción de las especies reactivas de oxígeno. El efecto beneficioso de EDTA es óptimo sólo cuando se introduce durante el desarrollo temprano. Así, EDTA se utiliza para manipular el perfil metabólico de los embriones durante una etapa específica de desarrollo, a fin de optimizar el metabolismo energético.

Revisión bibliográfica

Ya se han reportado algunas diferencias de género, desencadenadas por las condiciones de cultivo *in vitro* o por los componentes de los medios, principalmente por la presencia de glucosa, los cuales afectan de manera significativa no solamente la proporción natural de los sexos (Gutierrez-Adan *et al.*, 2001; Gutierrez-Adán, 2005), sino también la resistencia al enfriamiento. Nedambale *et al.* (2004) observaron una mayor acumulación citoplasmática de gotas lipídicas en embriones de vacas en comparación con los machos, lo que hace que las hembras presenten menor capacidad para tolerar el enfriamiento, afectando directamente su respuesta a sobrevivir a un proceso de criopreservación, por lo que los embriones macho producidos *in vitro* son más resistentes (Camargo *et al.*, 2008).

Otro aspecto importante en embriones de rumiantes es el papel intracelular de los lípidos, en la producción de ATP y otras funciones celulares. Los lípidos están presentes en las secreciones del tracto reproductivo y se acumulan en los embriones cultivados *in vitro* (Thompson *et al.*, 1995b; Ferguson y Leese, 1999).

Los embriones son sensibles a la producción de amoníaco, generados por la degradación espontánea de aminoácidos del cultivo, especialmente glutamina y aminoácidos del metabolismo. De ahí la implementación de la estrategia de sustitución de los medios de cultivo por medios frescos cada 2 días para optimizar las tasas de desarrollo. La importancia de eliminar el amoníaco radica en que puede inducir el "síndrome de ternero gigante" que se presenta en el cultivo embrionario (McEvoy *et al.*, 1999).

Algunos trabajos realizados demuestran que la utilización de un único medio de cultivo durante todo el período de desarrollo embrionario no permite el adecuado desarrollo del embrión, ya que las necesidades nutricionales van cambiando en la medida que él va creciendo, por lo que se han desarrollado los medios de cultivo secuenciales, para cada etapa de desarrollo (Nedambale *et al.*, 2006).

Los medios de cultivo más empleados para el desarrollo embrionario pre-implantación, en general, se componen de soluciones de sal e hidratos de carbono. Los medios más empleados son: Fluido oviductal sintético (SOF) (Tervit *et al.*, 1972; Gardner *et al.*, 1998; Boni *et al.*, 1999), Medio de optimización simple de potasio (KSOM) (Liu y Foote 1995), Medio Rosenkrans Charles 1 (CR-1aa, Rosenkrans y First, 1994), Medio Ham F10, medio Menezo B2, medio Fluido oviductal humano para cultivo *in vitro* 2 y 3 HTF/IVC-2/3 y Medio de cultivo de tejidos TCM-199, con la suplementación adicional de suero y/o un alimentador de capa de células somáticas (Niemann y Wrenzycki 2000).

Existe variación en los resultados obtenidos por el uso de diferentes medios de cultivo embrionario. Sagirkaya *et al.* (2006) compararon los medios de cultivo más comúnmente usados, el medio SOF que tiene mayor contenido de BSA y los medios KSOM y CR1, que

Revisión bibliográfica

tienen glutamina, mientras que SOF no la contiene. Los resultados obtenidos mostraron que aunque los medios difieren poco en su composición, el desarrollo a estado de blastocisto en medio de cultivo SOF fue significativamente más alto que en medios CR1 y KSOM ($p < 0,05$), aunque no hubo diferencias en tasas de desarrollo a estado 2 células, 8 células y mórulas entre los 3 grupos estudiados. El mayor número obtenido de blastocistos en medio SOF con aminoácidos puede ser debido al efecto inhibitorio y teratogénico de la glutamina sobre los embriones (Summers *et al.*, 2005). De igual manera, en estos resultados se demostró que los blastocistos cultivados en medio KSOM con aminoácidos presentan mayores tasas de implantación, por lo que tienen un efecto positivo en el desarrollo.

Las condiciones de cultivo empleadas con estos medios para desarrollo embrionario son las siguientes: temperatura óptima de 38.5°C-39 °C, 5.5 % de CO₂ en aire y 5%-7% de O₂. Tervit *et al.* (1972) alcanzaron mejores tasas de desarrollo en cigotos cultivados en atmósfera de 5% de O₂, en lugar del 20% del aire. Este microambiente es requerido para el desarrollo embrionario y se obtiene dentro de una cámara incubador modular, que contiene una mezcla de gases, con 87.5% de nitrógeno. El tiempo de cultivo es de 7-8 días y según el medio empleado, como en el caso del KSOM, se cambia a los 4 días a la segunda fracción del medio para brindarle al embrión los requerimientos según su desarrollo. En los primeros días de desarrollo embrionario, aparentemente el requerimiento proteico no es tan alto como al final.

Se ha demostrado que agentes estresantes del medio ambiente de cultivo como son radicales libres de oxígeno e incremento de la temperatura, inducen cambios en la expresión génica en embriones de bóvidos. Sagirkaya *et al.* (2006) reportaron que la expresión de HSP70 en medios de cultivo CR1 con aminoácidos y KSOM con aminoácidos fue significativamente mayor que en medio SOF con aminoácidos (Holm *et al.*, 1999, $P < 0.001$). La evolución normal del desarrollo establece, al primer día, una célula, al segundo día dos células, al tercer día 4 células, al cuarto día 8 células, al quinto día 16 células (mórula temprana), al sexto día estado de mórula, al séptimo día blastocisto temprano, séptimo–octavo día blastocisto y octavo–novenos día blastocisto expandido, al noveno día blastocisto eclosionado y al noveno–décimo día blastocisto expandido eclosionado. Con frecuencia, se presenta detención del desarrollo embrionario en el día cuarto, estado de 8 células por fallos durante la activación del genoma embrionario, lo cual se contrarresta parcialmente con β -mercaptoetanol y derivados de factores de crecimiento.

Los diferentes estados de desarrollo se pueden valorar mediante procedimientos de tinciones para embriones tempranos. Se emplea la coloración fluorescente de bisbenzimidá Hoechst 33322, con una longitud de onda de 365nm y se evalúan en microscopio con filtro de fluorescencia 200x y 400x. Los posibles embriones se clasifican según el estadio nuclear, que debe ser acorde al mencionado al inicio de este capítulo. Algunos presentan un PN sólo, sin la presencia de cabezas de espermatozoides, por lo que no fueron activados por penetración, si no divididos partenogénicamente.

IV.5. PROTEÓMICA

La proteómica es una tecnología en desarrollo que investiga la estructura y función del conjunto de proteínas que conforman el proteoma, mediante la comparación cualitativa y cuantitativa para identificar mecanismos celulares implicados en los procesos biológicos (Carbonaro, 2004). Por otra parte, la proteómica funcional se puede definir como una estrategia a la información analítica que permita comprender mejor funciones de las proteínas en los órganos normales (Zhang *et al.*, 2011).

Sin lugar a dudas, el Proyecto Genoma Humano es uno de los acontecimientos científicos más destacados de este nuevo siglo, pero la descodificación del genoma humano es sólo la punta del iceberg y lo más complicado e importante será conocer el papel biológico de los productos génicos (las proteínas).

El término “proteoma” fue usado por primera vez por Wilkins (1996). El proteoma representa en la célula todos los posibles productos de los genes, es un elemento altamente dinámico y sus componentes pueden variar en una o múltiples células, tejidos u organismos, en un momento dado, como consecuencia de cambios en su entorno. Sus manifestaciones pueden variar por traducción, post-traducción, regulación y procesos de degradación, entre otros, que afectan la estructura primaria, localización y función. Obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado. El análisis del proteoma con ayuda de la espectrometría de masas ha sido un gran avance con oportunidades para su aplicación en el ámbito de la reproducción (Wright *et al.*, 2012), y ha permitido el estudio de los espermatozoides y más concretamente sus proteínas (du Plessis *et al.*, 2011)

La proteómica tiene sus orígenes en la electroforesis en segunda dimensión (2D), la cual es considerada la piedra angular de la técnica de análisis del proteoma y fue desarrollada hace más de 3 décadas. El estudio de los genes no provee mucha información acerca del funcionamiento celular, porque las moléculas responsables de la función celular son proteínas y estas pueden sufrir más de 200 tipos de modificaciones post traslacionales (Yanagida 2002)

La misma proteína puede ser encontrada con diferentes propiedades y funciones, en diferentes ubicaciones. La proteómica busca caracterizar miles de proteínas expresadas dentro de las células, tejidos y organismos, con el fin de detectar biomarcadores de enfermedades y obtener mapas proteínicos, identificar nuevos sitios de fosforilación y detectar biomarcadores potenciales en reproducción (Du Plessis *et al.*, 2011)

Revisión bibliográfica

Para estudiar la expresión global de proteínas, identificarlas y caracterizarlas, inicialmente fue la electroforesis en una dimensión (1D) el método de elección; Sin embargo, el procedimiento sólo permite distinguir las proteínas por diferencia en su peso molecular. En este sentido, debe tenerse en cuenta que en un extracto, muchas proteínas pueden tener peso molecular idéntico o similar, por lo que la resolución del proceso es limitada (Witting y Schagger, 2008).

Con la electroforesis 2D se solucionó el problema de la limitada resolución de la electroforesis 1D, en razón a que las proteínas son separadas basadas en dos propiedades: su peso molecular (pm) y su punto isoeléctrico (pI). La combinación de las propiedades amplifica la capacidad de resolución del procedimiento. La principal aplicación de la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es resolver o diferenciar proteínas de la misma talla o peso, por lo que se convierte en la herramienta más empleada en el análisis y separación de los componentes del proteoma. Con la "2D-PAGE" se pueden resolver cientos o miles de puntos (*spots*) de proteína en un solo gel (Simula *et al.*, 2012)

La aparición o desaparición de puntos específicos de proteína indican diferencias en la expresión proteica, Mientras que el grado de intensidad de los puntos provee información cuantitativa acerca de los niveles de expresión de la proteína. Se pueden obtener mapas proteómicos de diversos complejos proteicos y generar bases de datos de geles bidimensionales, capaces de comparar patrones. Estos sistemas permiten la comparación automática de los puntos, para la identificación precisa de las proteínas, necesaria en el análisis cuantitativo (Simula *et al.*, 2012).

En diversos estudios, la proteómica ha sido la herramienta fundamental para identificar las propiedades y funciones de las proteínas que participan en el mecanismo de regulación de la función del aparato reproductor del macho, permitiendo entender las interacciones de las proteínas del plasma seminal con la superficie celular de los espermatozoides (Strzezek *et al.*, 2005).

IV.5.1. PROTEÓMICA DEL PLASMA SEMINAL

En los últimos años, diversos trabajos de investigación, mediante procedimientos de electroforesis bidimensional (2D-PAGE), han permitido demostrar que el plasma seminal de especies como la bovina contiene proteínas marcadoras, asociadas a toros de alta o baja fertilidad (Killian *et al.*, 1993, Jobim *et al.*, 2004, Moura *et al.*, 2006a, Rocoletta *et al.*, 2006., Kelly *et al.*, 2006., Moura *et al.*, 2007a; Novak *et al.*, 2010, Sankhala *et al.*, 2011a, 2011b, Stinshoff *et al.*, 2012).

En el plasma seminal se encuentran los prostasomas, pequeñas vesículas membranosas con diámetro de 50 nm, que son fuente de colesterol, fosfolípidos y proteínas. El fluido epididimal

Revisión bibliográfica

parece ser la principal fuente de prostasomas en carneros, humanos y toros en el plasma seminal (Assumpção *et al.*, 2005, Kelly *et al.*, 2006), aunque en toro también son secretados por las vesículas seminales (Agrawal y Vanha-Perttula 1987). Tienen alto contenido de esfingomielina y muchas proteínas asociadas a ellos, así como enzimas, P25b y PDC-109 (Girouard *et al.*, 2008). En humanos se ha observado actividad inmunosupresora como protección al ataque del complemento, incremento en la motilidad espermática y estabilización de la membrana plasmática del espermatozoide (Saez *et al.*, 2003, Caballero *et al.*, 2011).

Las proteínas en el plasma seminal están implicadas en varios procesos relacionados con la fertilidad: la preservación de la viabilidad de los espermatozoides en su proceso de maduración, las interacciones con el tracto reproductivo femenino, la protección y mantenimiento de la membrana celular frente a agentes externos (incluyendo eventos que producirían una prematura capacitación y/o reacción acrosómica, como es el caso del proceso de criopreservación) (Manjunath *et al.*, 1994a, 2002) y el proceso de fecundación (Topfer-Petersen *et al.*, 2005), por lo que el plasma seminal es una fuente potencial de los biomarcadores proteínicos para muchos trastornos del sistema reproductor masculino (Davalieva *et al.*, 2012).

El plasma seminal tiene componentes que modulan el proceso de unión espermatozoides-ADN, ya que el plasma seminal antagoniza con la unión del ADN exógeno, ejerciendo una poderosa protección del espermatozoide. El ADN exógeno interactúa con proteínas de 30-35 KDa, las cuales están presentes en la superficie de las células espermáticas (Lavitrano *et al.*, 1992). No obstante, los espermatozoides maduros tienen una protección natural para evitar la intrusión de ADN foráneo (Lavitrano *et al.* 1997). Por lo tanto, este factor juega un papel importante actuando como una barrera natural y protegiendo el espermatozoide de intrusiones de moléculas exógenas que pudieran comprometer su integridad y la identidad genética de la progenie (Spadafora 1998).

El plasma seminal contiene proteínas que pertenecen a dos familias: Espermadhesinas y un grupo con dominios Fibronectina tipo II. Esta última familia es la que predomina en la especie bovina y está representada por las proteínas BSP del plasma seminal del toro (Bovine seminal plasm, Binding sperm proteins, (Phospholipid-binding proteins), que incluyen la proteínas BSP A1- BSP A2 o PDC 109, BSP A3 y BSP de 30 kDa. Inicialmente las proteínas fueron llamadas según las cadenas de aminoácidos, por ejemplo, PDC 109 y la letra A por su naturaleza ácida. Las proteínas BSP se encuentran en casi todos los mamíferos (Manjunath *et al.*, 1987, 1989), y proteínas homólogas de BSP también están presentes en cerdos, machos cabríos, caballos y carneros (Manjunath *et al.*, 2007). Proteínas similares a las BSP están presentes en secreciones del plasma seminal de humanos, hámster y cerdos.

La otra familia presente en el plasma seminal bovino, las espermadhesinas, son las principales proteínas en la especie porcina y equina, pero también se han encontrado proteínas homólogas a esta familia en bóvidos.

IV.5.1.1. Proteínas BSP.

Inicialmente nombradas como BSP, "*bovine seminal plasm*" y debido a recientes descubrimientos de numerosos genes pertenecientes a la familia BSP, Manjunath *et al.*, (2009) propusieron, en colaboración con el comité de nomenclatura genética, HUGO, una nueva nomenclatura para identificar a la superfamilia de proteínas BSP: "Binding sperm proteins" (Soubeyrand *et al.*, 1997, Manjunath *et al.*, 2009). Las BSP constituyen la mayor fracción proteica (entre 50-70%) del plasma seminal del toro (Gwathmey *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2006, Manjunath *et al.*, 2007, 2009).

De las BSP A1/A2, BSP A3, BSP 30 kDa, la concentración de BSP-A1/-A2 (PDC 109) es más alta y representa el 38% del total, mientras que BSP-A3 y BSP-30-kDa representan el 3%-4% del total de la fracción proteica (Nauc y Manjunath. 2000). La relación de las cantidades relativas de proteína PDC-109: BSP-A3: BSP-30-kDa encontradas sobre la superficie del espermatozoide, representan proporciones de 4:1:1 (Nauc y Manjunath 2000).

Las proteínas BSP A1/-A2, BSP-A3 y BSP-30 kDa, colectivamente llamadas proteínas BSP, han sido halladas en varias especies domésticas, siendo más abundantes en toro, caprino (Souza *et al.*, 2012), ovino, equino, visón y un componente menor en plasma seminal de verraco, rata, ratón, hámster y hombre y recientemente halladas en búfalo (Harshan *et al.*, 2009). Recientes estudios reportan también las BSP1, BSP3 y BSP5 dentro de la familia *binder of sperm* o BSP (Fan *et al.*, 2006, Lusignan *et al.*, 2011). En Murinos, Plante *et al.*, (2012) identificaron la proteína BSPH1.

Estas proteínas interactúan con una variedad de ligandos, incluyendo diferentes tipos de colágeno, tienen capacidad de unión a fibrinógeno, heparina (Chandonnet, *et al.*, 1990), Apolipoproteína AI (apo-AI), lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Manjunath *et al.*, 1989) y calmodulina, lo que sugiere que estas proteínas son multifuncionales (Gasset *et al.*, 1997) y potencian la capacitación del espermatozoide inducida por heparina o por lipoproteínas de alta densidad (Manjunath y Sairam 1987, Manjunath y Therien, 2002).

IV.5.1.1.1. Propiedades bioquímicas de las BSP

Las proteínas BSP A1/A2 también llamadas gonadostatina o PDC-109, constituyen la fracción proteínica más abundante en el plasma seminal (20-40 % (Manjunath *et al.*, 1987, Calvete *et*

Revisión bibliográfica

al., 1994, y deben su nombre a 109 residuos de aminoácidos (Esch *et al.*, 1983). Tienen idéntica secuenciación de aminoácidos y difieren sólo en el grado de glicosilación, pero son una entidad química única (Esch *et al.*, 1983). Las BSP-A3 y BSP 30 kDa tienen diferente composición de aminoácidos respecto a la PDC-109 (Desnoyers *et al.*, 1992).

Todos los miembros de esta familia, con excepción de la BSP-A3, son glicosiladas. La BSP 30 kDa, tiene peso molecular de 28000 a 30000 Da. La BSP-30 kDa es la mayor glicoproteína ácida del plasma seminal del toro, muestra actividad de unión a heparina y fosfolípidos y consta de 158 aminoácidos (Calvete *et al.*, 1996b.), dispuestos en estructura de mosaico (Calvete *et al.*, 1996a). Las proteínas BSP son ácidas y se presentan en cadenas simples de polipéptidos (Manjunath y Sairan, 1987). En presencia de heparina, la PDC-109 conserva sus características conformacionales incluso con incrementos de temperatura hasta de 70-75°C (Sankhala *et al.*, 2011b).

Cada BSP está compuesta por un dominio único N-terminal, seguido por dos dominios de fibronectina tipo II (Fn2) (Manjunath *et al.*, 2007). Cada dominio de las BSP-A1/2 está conformado por 38-41 aminoácidos. La BSP- A1 contiene un trisacárido, la BSP-A2 contiene 1 disacárido y la BSP 30 kDa contiene 6 trisacáridos (Fan y Manjunath 2006). Comparando la secuencia idéntica de aminoácidos de las tres BSPs, se encontraron las siguientes relaciones de similitud en conformación: entre PDC-109 y BSP-A3, un 71.4%; entre PDC-109 y BSP-30kDa, un 53.8%, y entre BSPA3 y BSP-30kDa, un 57.5%.

Estas proteínas tipo Fibronectina II modulan la espermiogénesis por activación de la liberación de fosfatidilcolina y colesterol de las células espermáticas. Scolari *et al.* (2010) comprobaron que la PDC 109 disminuye o activa la movilidad rotacional del colesterol dentro de la membrana, debido a interacción con regiones específicas de aminoácidos (CRAC) que conforman la proteína.

Sankhala *et al.* (2011a) demostraron *in vitro* para la PDC-109 similitudes en su función como molécula chaperona. Sus estudios sugieren que puede asistir el correcto plegamiento de proteínas, algunas de ellas involucradas en los procesos de capacitación espermática y pueden suprimir la agregación no específica de proteínas diana.

Kelly *et al.* (2006), analizando en el plasma seminal de *Bos taurus* las proteínas de la familia BSP por electroforesis 2D y cromatografía líquida, identificaron 99 proteínas, de las cuáles 64, son componentes menores que no habían sido identificadas anteriormente y otras habían sido reportadas en otras especies. Al caracterizar las proteínas del plasma seminal del toro por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, encontraron los siguientes puntos de referencia: BSP-A1, con Pm de 16.5 kDa y rango de pl de 4.7–5.0, BSP-A2 con 16 kDa y pl de 4.9–5.2, BSP-A3 con 15 kDa y pl de 3.6–5.2 y BSP-30-kDa con 25-28 kDa y pl de 3.9,4.8. La heterogeneidad de BSP-30 kDa se debe principalmente a su contenido de ácido siálico.

Revisión bibliográfica

Residuos de aminoácidos que interactúan con la fosforilcolina son conservados entre PDC-109, BSP-A3y BSP 30 kDa, indicando similitudes en los sitios en que las BSP interactúan con la membrana plasmática. Sin embargo el mapa del potencial electrostático de la BSP-A3 muestra un fuerte potencial negativo en la superficie del espermatozoide, mientras que el mapa de la PDC-109 y la BSP 30 kDa muestra potencial positivo en la superficie. Estas diferencias explican por qué Thérien *et al.* (1998, 1997) observaron que la BSP-A3 es menos efectiva al estimular la salida de colesterol y fosfolípidos de la membrana plasmática espermática que la PDC-109 y la BSP 30 kDa (Gwathmey *et al.*, 2006, Figura 8).

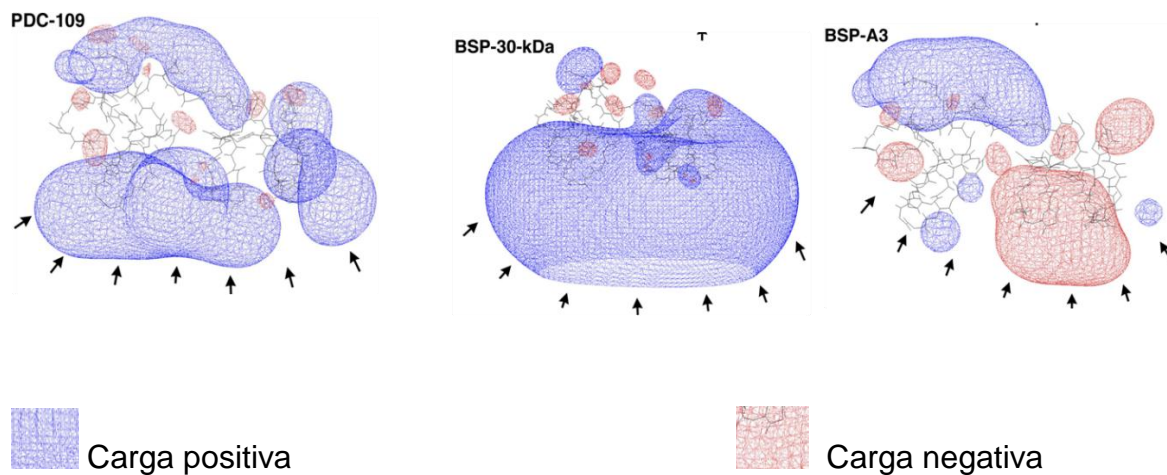


Figura 8. Mapa del potencial electrostático de los dominios FN2 de la familia BSP. Las flechas indican los sitios de unión del espermatozoide a la proteína BSP (Tomado de Gwathmey *et al.*, 2006).

IV.5.1.1.2. Rol biológico de las BSP.

Las BSP son secretadas por las vesículas seminales y se adsorben a la superficie del espermatozoide durante la eyaculación (Thérien *et al.*, 1997) localizándose, principalmente, en la pieza intermedia del flagelo y de manera poco uniforme en la cabeza, acrosoma y post-acrosoma (Manjunath, *et al.*, 1993, Manjunath *et al.*, 1994b), lo que evita el movimiento libre de los fosfolípidos y estabiliza la membrana.

Tras la eyaculación, los espermatozoides se mezclan con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, entre las que se encuentran las proteínas BSP (Manjunath *et al.*, 2007), que remueven o extraen selectivamente colesterol y fosfolípidos (fosfatidil colina) produciendo una reorganización estructural de la membrana plasmática. Los sitios de unión-adsorción de

Revisión bibliográfica

las BSP con la membrana plasmática son los fosfolípidos de colina de la membrana (Desnoyers y Manjunath 1992), que constituyen más del 60% de los fosfolípidos de la membrana espermática, específicamente fosfatidilcolina (PC), fosfatidilcolina plasmalógeno (PC Plasm) y esfingomielina-SPM (Desnoyers y Manjunath 1992; Manjunath y Chandonnet 1994b).

Las BSP interactúan también con heparina, Apolipoproteína A-I (ApoA-I), principal proteína de las lipoproteínas de alta densidad (Manjunath *et al.*, 1989). Dentro de los 10-20 minutos siguientes, el espermatozoide viaja a través del moco cervical en el útero, dejando atrás la mayor parte de fluido seminal. La acción de las BSP junto con la salida del colesterol, induce la reorganización de la membrana. Además, la unión de las BSP a los fosfolípidos de la membrana puede prevenir el movimiento de fosfolípidos y estabilizar la membrana. El espermatozoide es recubierto por las BSP y va viajando por el tracto reproductivo femenino, donde va siendo capacitado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Manjunath *et al.*, (1994a), demostraron que cada proteína BSP sola era capaz de estimular la salida de colesterol del espermatozoide epididimario, en dosis y tiempo dependiente. En sus experimentos se evidenció que el 25% del colesterol del espermatozoide fue removido a las 4 horas de haber expuesto el espermatozoide a las BSP. Posteriormente, se alcanzó una fase de estacionamiento en la remoción, debido a la saturación de salida de partículas con colesterol. Estos autores postularon que la remoción de colesterol por las BSP también estaba acompañada por la remoción de fosfolípidos, como apolipoproteínas (Rodríguez-Martínez, 2000, Tannert *et al.*, 2007, Sankhala *et al.*, 2011a).

El espermatozoide unido a las proteínas BSP puede interactuar con HDL y estimular la segunda salida de colesterol (Müller *et al.*, 1998, Gwathmey *et al.*, 2003) del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino, lo cual resulta en una disminución en la relación colesterol/fosfolípidos. Desde que el colesterol es reorganizado, se estabiliza el efecto sobre la membrana (Yeagle, 1985, Desnoyers y Manjunath 1992, Thérien *et al.*, 1998). Esta salida se espera que provoque más reorganización o desestabilización de la membrana (Thérien, *et al.*, 1998).

Las BSP A1/A2 son las principales proteínas del plasma seminal del toro que se unen a la heparina (Calvete *et al.*, 1999), lo que afecta positivamente la fertilidad, razón por la que se emplean *in vitro* para capacitar los espermatozoides del toro. Parrish *et al.* (1989) y Bosch *et al.* (2001) demostraron que la adición de heparina a los espermatozoides del toro, unidos a cultivos de epitelio endosalpingeal, aumenta la liberación de los espermatozoides del epitelio.

La unión de proteínas BSP a la membrana espermática incrementa el número de sitios de unión de heparina sobre la superficie del espermatozoide (Manjunath y Therien 2002, Gwathmey 2006). La heparina, presente en el tracto reproductivo de la hembra y los GAG

Revisión bibliográfica

(Glicosaminoglicanos) (Therien *et al.*, 2005) y HDL, componentes de los fluidos folicular y oviductal, inducen la capacitación espermática (Chandonnet, y Roberts 1990). La unión de la PDC-109 a la heparina provoca un aumento significativo de la estabilidad térmica de la PDC-109, manteniendo su estructura bioquímica estable frente a cambios de temperatura y pH, cuando se compara a con la proteína nativa (Sankhala *et al.*, 2011a). El proceso de capacitación espermática se ve ayudado por compuestos, como la Caltrina, un péptido de 6 kDa, aislado del fluido seminal. El fluido folicular y oviductal también contienen factores como heparina y HDL. La proteína PDC 109 del plasma seminal del toro modula la maduración de las células espermáticas removiendo lípidos, principalmente fosfatidilcolina y colesterol de su membrana extracelular.

Los mecanismos de salida del colesterol, mediados por proteínas BSP son unidireccionales (Moreau *et al.*, 2000) y una breve exposición a BSP no estimula la capacitación del espermatozoide epididimal en ausencia de heparina o HDL (Manjunath y Therien 2002, Fernández-Juan *et al.*, 2006),

Lafleur *et al.* (2010) demostraron que las interacciones entre la proteína BSP A1 y los modelos de membrana compuestos por fosfatidilcolina llevan a drásticos cambios en la morfología de los lípidos auto-ensamblados, y mostraron que en presencia de proteína, las vesículas alargadas de lípidos forman un collar de perlas (Figura 9) como las estructuras que evolucionan hacia vesículas o pequeñas estructuras filiformes.

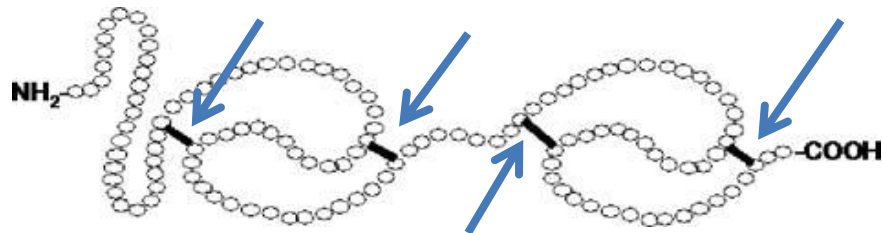


Figura 9. Estructura bi-dimensional de la familia de proteínas BSP. Las flechas indican los cuatro puentes disulfuro (Modificado de Lafleur *et al.*, 2010).

En ganado bovino, la PDC-109 (BSP-A1/A2) se une a la fucosa, la cual al parecer participa en la formación del reservorio oviductal por permitir la unión del espermatozoide al mismo. De igual manera, la BSP-A3 y BSP-30-kDa aumentan cada una la unión del espermatozoide al epitelio oviductal (Gwathmey *et al.*, 2006, Ignatz *et al.*, 2001). Este fenómeno que conlleva a la pérdida de afinidad de los espermatozoides capacitados por el oviducto, por la eliminación de estas proteínas de la membrana espermática durante el proceso de capacitación, brinda un efecto protector sobre la motilidad espermática durante su almacenamiento en el epitelio oviductal (Gwathmey *et al.*, 2006, Figura 10)

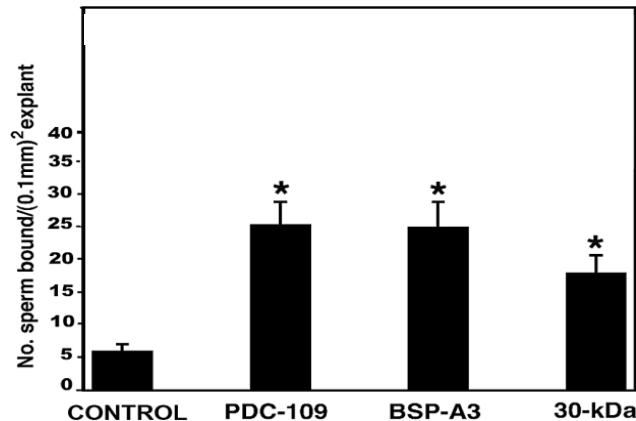


Figura 10. Las proteínas de la familia BSP, mejoran el almacenamiento del espermatozoide epididimal en el oviducto. $p < 0.001$ (Tomado de Gwathmey *et al.*, 2006)

Datos experimentales indican que la fucosa es la fracción que se encuentra relacionada en la interacción entre el epitelio oviductal y el espermatozoide de la especie bovina (Lefebvre *et al.*, 1997, Bosch y Wright 2005). Tras la eyaculación, la proteína PDC-109 (BSP-A1/A2), asociada con la membrana plasmática del espermatozoide, le permite a los espermatozoides unirse al epitelio oviductal (Gwathmey *et al.*, 2003, Ignatz *et al.*, 2001). Este mecanismo propuesto (Figuras 11 y 12) explica la limitada capacidad de unión al epitelio oviductal de los espermatozoides que no han estado en contacto con los fluidos seminales (Gwathmey *et al.*, 2003, Petrunkina *et al.*, 2001).

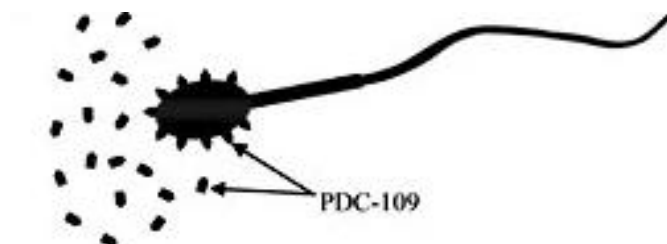
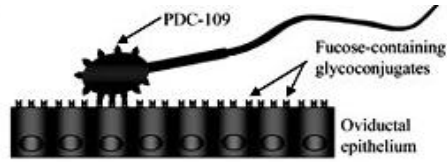


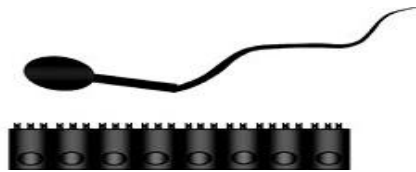
Figura 11. Bosch y Wright (2005) proponen un modelo que explica la asociación y posterior liberación de los espermatozoides de toro desde el epitelio oviductal (Adaptado de Suárez, 2002 por Bosch y Wright 2005).

Revisión bibliográfica

La presencia de PDC-109 libre en el plasma seminal impediría la unión de los espermatozoides al oviducto



En las células oviductales, la PDC-109, adherida a la superficie espermática, se une con residuos de Fucosa lo que permite la adherencia de los espermatozoides al oviducto y la formación del reservorio



Tras la capacitación espermática, se pierde la PDC-109, lo cual facilita la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal.

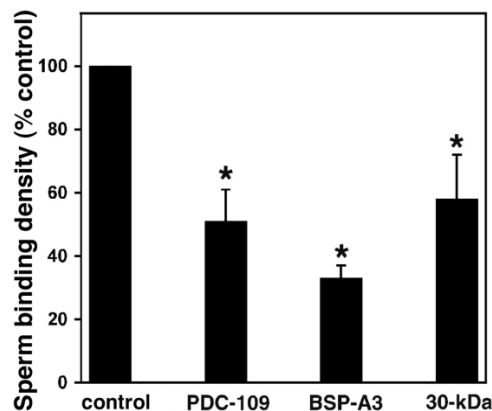


Figura 12. El exceso de proteínas BSP inhibe competitivamente la unión del espermatozoide al epitelio oviductal ($P < 0.001$) (Tomado de Gwathmey *et al.*, 2006).

Durante la capacitación, la PDC-109 y probablemente las otras dos BSP se pierden del espermatozoide. Una vez capacitado el espermatozoide, éste pierde afinidad de unión al epitelio oviductal, por lo que la pérdida de las BSP durante la capacitación juega un rol clave en la liberación del espermatozoide del reservorio oviductal (Gwathmey, 2003).

Revisión bibliográfica

Recientemente, Jois *et al.*, (2010), identificaron la BSP5 bovina, perteneciente a la familia BSP. La BSP5 con pm de 13 kDa, al igual que otros miembros de su familia, juega un rol en la capacitación espermática por remoción de colesterol y salida de fosfolípidos (Manjunath *et al* 2002 y Lefebvre *et al.*, 1997).

La PDC-109 (BSP/A1 y BSP/A2) puede desempeñar un papel en la preservación de la fertilidad del semen del toro, mientras que los espermatozoides están almacenados (Greube *et al.*, 2001, Müller *et al.*, 2002), ya que también contribuye a la estabilidad de la membrana mediante la inhibición de la actividad de la fosfolipasa A. Manjunath *et al.*, 1994a), demostraron que *in vitro*, la actividad de la proteína Kinasa C es inhibida por la PDC-109, y propusieron que esto sirve para prevenir la prematura reacción acrosómica del espermatozoide en el tracto reproductor femenino. Thérien *et al.*, 2001), le adjudica otra función a la PDC-109: prolongar la supervivencia espermática durante el almacenamiento en el oviducto, proceso éste reforzado por la ayuda de la BSP A3 y la BSP-30kDa (Moura *et al.*, 2006b).

Todos los procesos anteriores permiten al espermatozoide permanecer estabilizado por unión al epitelio oviductal, en el tracto reproductivo de la hembra, hasta que el ovocito alcance el sitio para la fecundación y agentes capacitantes entren en el área de almacenamiento a iniciar la capacitación. Durante este tiempo de almacenamiento unido al epitelio oviductal, la motilidad, viabilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide se mantienen (Suarez, 1998, Suarez 2002). Lo anterior se corrobora *in vitro*, donde el cultivo con células del epitelio oviductal y sus secreciones son beneficiosas para la motilidad espermática (Gwathmey *et al.*, 2006).

Por otra parte, en el tema de protección, las proteínas BSP también se unen a componentes de diluyentes del semen, como yema de huevo, lipoproteínas de baja densidad y caseína de leche, usados para preservar el semen en procesos de congelación, ayudando en este tema a los espermatozoides durante su almacenamiento en nitrógeno líquido. Lusignan *et al.* (2011), mediante cromatografía de filtración de gel de las fracciones de la leche, comprobaron la interacción entre proteínas BSP y proteínas de la leche, que puede ser el origen de la protección del espermatozoide durante la preservación en leche. La caseína, la mayor proteína de la leche se ha propuesto como la responsable de este efecto protector. Dentro del fraccionamiento que se le hizo a la leche se encontró que la BSP-1 es la de mayor afinidad a las proteínas de la leche comparada con BSP3 y BSP5. Sin embargo, la continua exposición del espermatozoide al plasma seminal que contiene las BSP, es perjudicial para la membrana espermática, ya que la puede volver muy sensible al almacenamiento del espermatozoide en estado líquido o de congelación (Manjunath *et al.*, 2007), por los cambios inducidos por la salida de colesterol y fosfolípidos. Una significativa disminución del 70-80% en la unión del espermatozoide a las proteínas BSP, fue observada después de la crío-preservación. , (Manjunath *et al.*, 2007, Calvete *et al.*, 1996a).

Revisión bibliográfica

Pérez-Pé *et al.* (2001 b) reportaron en carneros que la adición de proteínas del plasma seminal a pajillas seminales, antes del tratamiento del shock por frío, evita lesiones en la membrana espermática del espermatozoide, por ejercer un efecto protector sobre la misma. Este efecto de adsorción de las proteínas del plasma seminal en la membrana plasmática es preventivo y reparador. Las proteínas de 14 kDa (P14-RSVP14) y 20 kDa (P20-RSVP20) identificadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 2D-PAGE son las responsables del efecto crioprotector en carneros (Barrios *et al.*, 2005).

Así, estudios de Barrios *et al.*, (2000), Jobim *et al.*, (2004) y Cardozo *et al.*, (2009), indican que las proteínas del plasma seminal revierten el daño del shock por frío sufrido por el espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación, donde se producen especies reactivas al oxígeno (ROS), afectando la integridad de la membrana espermática, produciendo daños irreversibles sobre el DNA y la motilidad espermática, que conllevan a disminución de la penetración de ovocitos y fusión del espermatozoide (Aitken 1995b).

Recientes estudios, de Martínez-Soto *et al.* (2010) en humanos reportan que la genisteína, una isoflavona de soja con actividad estrogénica a concentración de 1 $\mu\text{mol/L}$ y 10 $\mu\text{mol/L}$, mejora la criopreservación del semen por sus propiedades antioxidantes, disminución de producción de ROS y por modificación de los procesos de capacitación y reacción acrosómica, lo que reduce el daño de la membrana espermática, preserva la integridad del DNA e incrementa ligeramente la motilidad y viabilidad.

Varias proteínas BSP son comunes al plasma seminal y el fluido epididimal de mamíferos, tales como: α -1-atirypsin, clusterina, lactoferrina, glutatión peroxidasa, prostaglandina D2 sintetasa y superóxido dismutasa (Lafleur *et al.*, 2010). Es interesante observar que la presencia de proteínas en el fluido epididimal no necesariamente indica su presencia en plasma seminal (Mortarino *et al.*, 1998), pero algunas de las proteínas reportadas en el plasma seminal han sido reportadas en fluido epididimal de varios mamíferos ya que éste contribuye al eyaculado en espermatozoides o en pequeñas vesículas membranosas presentes en el plasma seminal (Kelly *et al.*, 2006). Sin embargo, las BSP son proteínas principalmente provenientes de las vesículas seminales. El epidídimo es un sitio de secreción y reabsorción de proteínas. Esta reabsorción es selectiva y algunas proteínas que se encuentran en la porción proximal del epidídimo no se encuentran en su porción distal. El fluido producido por el epidídimo se diluye alrededor de 8-10 veces cuando se mezcla con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, en la eyaculación (Gerena *et al.*, 1998). Esto hace difícil identificar con precisión las proteínas epididimales en el plasma seminal y si son secretadas por las glándulas sexuales accesorias (Moura *et al.*, 2006a). Los espermatozoides epididimales están desprovistos de proteínas BSP, mientras que los espermatozoides eyaculados presentan BSPs adsorbidas a su membrana (Manjunath *et al.*, 1994a).

Sin embargo, las proteínas BSP no son el único grupo de proteínas que promueven la capacitación del espermatozoide y tienen implicación en la regulación de la exocitosis

acrosomal; existen otras proteínas como: Espermadhesinas (Z-13), proteína ácida del fluido seminal (a SFP), fosfolipasa A2 (PLA-2), Plasmina seminal (SPLN), proteínas del shock calórico (HSPs) y Osteopontina (OPN), Clusterina, prostaglandina D-sintetasa tipo Lipoclina Lipocalin (PDGS) (SP26), entre otras, que serán tratadas a continuación.

IV.5.1.2. Espermadhesinas

Las espermadhesinas integran la otra familia de importancia presente en el plasma seminal, (Haase *et al.*, 2005, Tedeschi *et al.*, 2000, Burns *et al.*, 2011). Se identifican dos componentes de esta familia, la **aSFP (proteína ácida del fluido seminal)** y la **Z13**. Las espermadhesinas son importantes glicoproteínas de bajo peso molecular de 12-16 kDa, compuestas por entre 109 y 133 aminoácidos. Son una familia que pertenece al grupo de proteínas de unión a la heparina, (HBPs: *heparin binding proteins*) que recubren la superficie de los espermatozoides en la eyaculación y participan en el proceso de capacitación. Son proteínas multivalentes, con capacidad de unir diversos tipos de ligandos y son las de mayor presentación en plasma seminal de suinos y équidos; además, están involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito (Bergeron *et al.*, 2005).

En la especie porcina, las PSP-I y PSP-II son las espermadhesinas más abundantes en el plasma seminal, mientras otras están presentes pero en menor cantidad como la AWN, AQN-1, AQN-3 (Calvete *et al.*, 1997). En équidos, se han encontrado la HSP1, HSP2 y HSP-7 (Reinert *et al.*, 1996). En el plasma seminal de carnero se encontró la espermadhesina de 15.5 kDa, con actividad estacional y localizada en la pieza intermedia del flagelo. Otras de importancia son: RSVP14, RSP15 (Bergeron *et al.*, 2005, Cardozo *et al.*, 2006a), GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa y GSP-22 kDa (GSP, *Goat Seminal Plasma Proteins*), homóloga a las BSP de toros. Todos estos resultados indican que la familia de las BSPs es ubicuitaria en el plasma seminal de mamíferos, existiendo diversas formas según la especie y probablemente con una función biológica común.

IV.5.1.2.1. Z-13: Es una glicoproteína conformada por dos puentes disulfuro, con subunidades de 13 kDa, no es glicosilada y no se une a la heparina. Su secuencia de aminoácidos es similar en un 50% a la aSFP bovina (Tedeschi *et al.*, 2000). Presenta una relación inversa con la fertilidad, de hecho fue llamado factor antifertilidad, mostrando mayor intensidad en su presentación, en fluido de glándulas accesorias de toros reproductores de baja fertilidad (Moura *et al.*, 2006b, Jobim *et al.*, 2009, Dostolava *et al.*, 1994) (Figura 13).

La espermadhesina Z-13, es la segunda en abundancia en el plasma seminal del toro, después de las BSP A1/A2 (Moura *et al.*, 2007a).

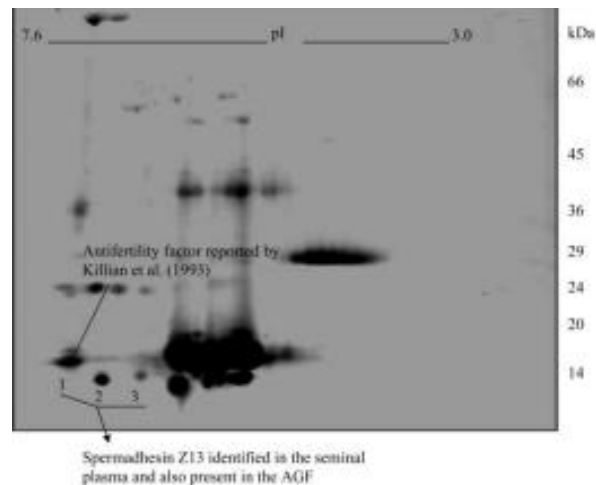


Figura 13. Identificación de Espermadhesina Z-13, en un perfil proteico en el plasma seminal de toros lecheros, de fertilidad indexada, reportada como factor antifertilidad. Identificada en el plasma seminal y en el fluido de las glándulas sexuales accesorias (Moura *et al.*, 2006 b).

Residuos de esta molécula Z-13 bovina, presentan similitud con la espermadhesina porcina PSP-1, aunque muestran diferentes características y tiene 43% de homología con inhibidores de la motilidad espermática (SPMI) en plasma seminal de humanos (Tedeschi *et al.*, 2000).

IV.5.1.2.2. aSFP (acid seminal fluid protein): Es secretada por vesículas seminales, ampollas y epidídimo (Moura *et al.*, 2010), pero no por el testículo. Se une a la superficie del espermatozoide eyaculado y actúa como un factor decapacitante del espermatozoide del toro, previniendo la prematura capacitación y reacción acrosómica (Dòstolová *et al.*, 1994). Es un factor de crecimiento, con efectos sobre las células granulosas del ovario. Tiene de 110 a 130 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 14 kDa. A diferencia de la espermadhesina porcina, la aSFP bovina no es glicosilada y no se une a heparina, ni se une al espermatozoide o zona pelúcida (ZP), por lo que no juega un rol en la interacción de gametos (Dostalova *et al.* 1994).

Presenta un efecto dosis dependiente y altos niveles de esta proteína pueden inhibir la motilidad espermática y la actividad mitocondrial (Schoneck *et al.*, 1996). Se pierde del espermatozoide después de la capacitación (Caballero *et al.*, 2012). Paradójicamente, Roncoletta *et al.*, (2006) la encontraron aumentada 8.5 veces en membrana espermática, en toros Nelore de mayor fertilidad.

Debido a su efecto decapacitante para que se produzca la fecundación *in vitro*, es necesario que se libere esta proteína de la membrana espermática. Muestra poder de preservación de la membrana espermática por poseer un efecto antioxidante sobre la peroxidación lipídica de la

membrana celular en el espermatozoide *in vitro* (Schoneck, 1996) por lo que se explica su presencia cuantitativamente mayor en toros con mejor congelabilidad del semen (Jobim *et al.*, 2004). La aSFP es también conocida como inhibidora del estrés oxidativo (Schoneck *et al.*, 1996).

IV.5.1.3. Fosfolipasa A₂ (PLA-2)

Esta proteína del plasma seminal del toro, presenta un peso molecular de 60 kDa y un pI de 5.6 (Soubeyrand *et al.*, 1998, Moura *et al.*, 2007a). Se relaciona con las proteínas asociadas a mayor fertilidad, se encuentra presente en la superficie del espermatozoide de toro, acrosoma y pieza media, pero no en espermatozoide epididimal, lo que demuestra que algunas fosfolipasas son adsorbidas del plasma seminal a la superficie del espermatozoide (Miller y Winer 1990).

Estas proteínas se unen a la superficie del espermatozoide en la eyaculación, por interacción con fosfolípidos de colina en la membrana espermática y participan en la modificación lipídica de la misma durante la capacitación (Kelly *et al.*, 2006) y en la síntesis de ácido araquidónico. Participa en la interacción espermatozoide-ovocito, siendo activada por la interacción con la zona pelúcida (Riffo y Párraga 1997, Yuan *et al.*, 2003). También participa en la reacción acrosómica, fusión de membranas y tiene actividad antimicrobial (Moura *et al.*, 2007a). La proteína BSP-5 promueve la fecundación, por estimular la salida de colesterol, pero grandes cantidades van en detrimento de la fertilidad (Manjunath.*et al.*, 2002) Además, se ha demostrado su efecto inhibitorio sobre la actividad de PLA2 (Manjunath *et al.*, 2002).

IV.5.1.4. Plasmina seminal (SPLN)

Esta es conocida como la proteína antimicrobiana secretada por las glándulas accesorias (Sitaram *et al.*, 1997), e interacciona con las membranas espermáticas provocando un aumento en su fluidez que pudiera estar relacionado con la preparación de la célula para la reacción acrosómica (Shivaji *et al.*, 1989). Inhibe la actividad de la acrosina en la exocitosis y actúa como un regulador del transporte de calcio en el espermatozoide bovino (Sitaram *et al.*, 1997).

IV.5.1.5. Proteínas del shock calórico (HSP)

Las proteínas del shock calórico (HSP) son el producto de varias familias de genes que se han nombrado según su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y la de menor peso: HSP25/27 (Beere, 2004). Estas proteínas HSP (*Heat shock proteins*), son constituyentes normales de las células y su síntesis se aumenta con la exposición a diversas formas de

Revisión bibliográfica

estrés, por lo que participan de manera importante en los mecanismos de aclimatación y adaptación (Baraja-Vázquez *et al.*, 2005). Se han descrito como chaperonas moleculares, que participan en el ensamblaje y transporte de proteínas y polipéptidos, tanto en condiciones normales como por estímulos estresantes e interactúan con diversos sustratos de proteína, asistiendo las proteínas en su plegamiento (Georgopoulos y Welch 1993, Garrido *et al.*, 2001). De ahí que el nivel de adaptación de un organismo ante un estresor está en función de la expresión de HSP. Son reguladoras del mecanismo de apoptosis (antiapoptóticas y proapoptóticas), en particular, HSP27 y HSP70 podrían participar en la carcinogénesis (Garrido *et al.*, 2001). En relación con la apoptosis, intervienen en la eliminación de las células dañadas.

El mecanismo de las HSP para mantener la supervivencia celular se correlaciona con la inhibición del mecanismo de activación de las caspasas (Beere, 2004). En el contexto de la reproducción, las HSP participan en dos procesos claves de la fisiología ovárica, estando involucradas en los mecanismos de crecimiento celular, proliferación/apoptosis y en la acción de hormonas esteroideas mediadas por sus receptores (Helmbrecht *et al.*, 2000). De igual manera, están involucradas en la patogénesis de ovario quístico (COD) (Isobe y Yoshimura, 2000, Salvetti *et al.*, 2007).

En condiciones adversas y como mecanismo de defensa del organismo ante cambios abruptos de tipo físico y químico, se expresan estas proteínas HSP, mediante unión a proteínas parcialmente desnaturalizadas, disociando agregados de proteínas y regulando el plegamiento correcto y la traslocación intracelular de proteínas sintetizadas de novo (Goodman y Blank, 1998). Estas proteínas son inducidas a sobreexpresarse por diversos agentes estresantes además del calor, como anoxia, infecciones virales, intoxicación con metales pesados y radiación ultravioleta.

Bañuelos-Valenzuela *et al.* (2005) encontraron que el miembro de la familia HSP que participa más activamente durante el estrés producido por el calor es la HSP70, uniéndose a proteínas desplegadas o plegadas inadecuadamente y ayudando a corregirlas y al transporte de las mismas (Kopecek, *et al.*, 2001).

La HSP60 y la HSP70 se encargan del transporte bidireccional entre la mitocondria y el citoplasma, ya que la condición mitocondrial se vería más activa en condiciones de estrés, porque las células obligatoriamente utilizan esta organela en el metabolismo de reservas energéticas, como carbohidratos para obtención de energía por lo que, en privación de alimentos aumenta la HSP60 y HSP70. La HSP90 es una chaperona que previene el plegado de proteínas desnaturalizadas por extremas temperaturas durante el choque térmico y protege selectivamente a las mitocondrias.

IV.5.1.6. Osteopontina (OPN)

La Osteopontina es una es una glicoproteína ácida multifuncional del plasma seminal, adquirida en la eyaculación (Souza *et al.*, 2008), que se relaciona con toros de alta fertilidad valorados y comparados en centros de inseminación artificial (Moura *et al.*, 2006a). Moura (2005) encontraron una correlación positiva ($r = 0.48$) de esta proteína con toros de alta fertilidad. Varios mecanismos han sido atribuidos para relacionar la OPN con la fertilidad (Cancel *et al.*, 1999), de manera indirecta, a través de protección de la superficie epitelial de glándulas sexuales accesorias contra infecciones bacterianas (Brown *et al.*, 1992).

La OPN está constituida por 278 residuos de aminoácidos (Moura 2005). Killian *et al.* (1993) determinaron su peso molecular en 55 kDa con pl 4.5. En reportes de Denhardt *et al.* (2001) y de Wai y Kuo (2004), su peso molecular varió de 25 a 80 kDa.

Las fuentes principales de OPN en el plasma seminal son la ampolla y las vesículas seminales. No se detectó en tejidos de testículo, epidídimo, próstata y glándulas bulbo uretrales (Cancel *et al.*, 1999) pero se localiza en la cola y cabeza del espermatozoide. En cuanto a su estructura, es una proteína rica en ácido aspártico, ácido glutámico y serina. La OPN bovina muestra homología del 40% en su secuencia de aminoácidos con la OPN de ratón, humano y cerdo. Pertenece a la familia de proteínas SIBLINGS (*small integrin-binding ligand, N linked glycoprotein*) (Moura 2005).

La OPN se expresa en diversos tipos celulares, es detectada en fluido de glándulas sexuales accesorias, células óseas, células tumorales en proceso de remodelación y es secretada por numerosos tipos de cáncer humano. Interviene también en la prevención de apoptosis (Wai y Kuo, 2004). En los túbulos seminíferos es sintetizada por células de Sertoli (Siiteri *et al.*, 1995) y células germinales. La OPN está potencialmente involucrada en la adhesión celular y la migración. La expresión genética de la OPN fue detectada sólo en los túbulos seminíferos que contenían espermátidas elongadas, lo que sugiere que la expresión varía con el estado del epitelio de los túbulos (Souza *et al.*, 2008). La expresión primaria de la OPN fue observada en las células epiteliales de la ampolla (Rodríguez *et al.*, 2000).

En procesos de maduración *in vitro* se obtuvieron mayores porcentajes ($P < 0.01$) de división y mórulas-blastocistos compactos (79.7 y 43.3% respectivamente), en tratamientos con OPN frente al grupo control (56.4% vs. 42.0%, $P < 0.05$). La capacitación fue también valorada, y los grupos tratados con OPN presentaron espermatozoides mejor capacitados ($P < 0.01$, 14.4 y 13.6%, respectivamente) que el grupo control (8.3%), por lo que este estudio concluyó que la OPN mejora la eficiencia de producción *in vitro* de embriones e influencia la capacitación espermática (Monaco *et al.*, 2009, Killian *et al.*, 1993, Moura 2005) estando involucrada en la unión espermatozoide-ovocito, fecundación y desarrollo embrionario temprano (Moura 2007a) (Figura 14).

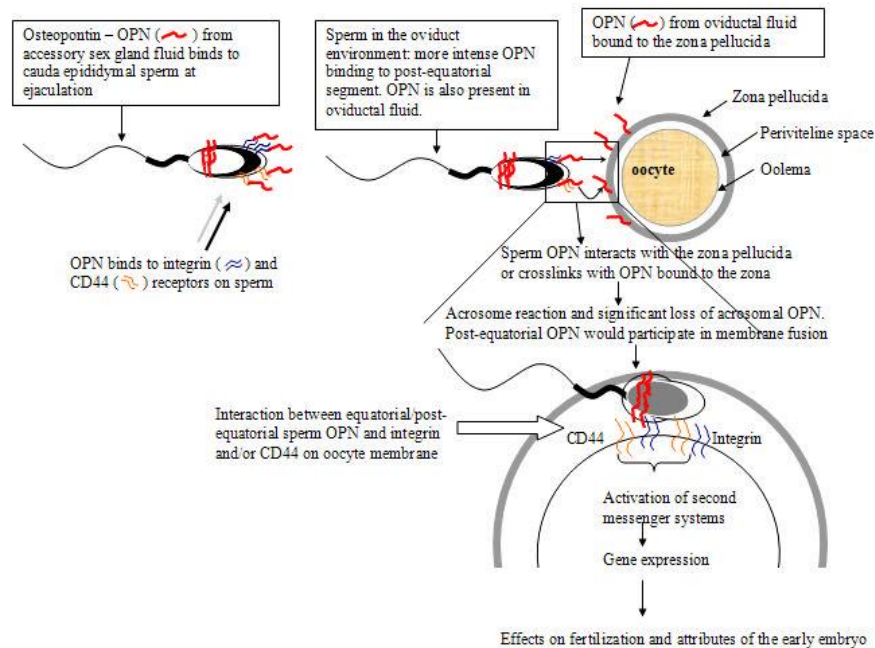


Figura 14. Modelos de unión de las proteínas del plasma seminal A1/A2, 30 kDa y Osteopontina (OPN) en espermatozoides eyaculados, antes y después de la incubación con fluido oviductal ístmico y ampular (Souza *et al.*, 2008).

La OPN se une al espermatozoide eyaculado a través de receptores de la familia integrina, que tienen un importante papel en la unión espermatozoide-ovocito y en la implantación y preimplantación. Esto explicaría la relación de la OPN con la fertilidad. Esta compleja unión de la OPN con integrinas del ovocito es soportada por el hecho de que los ovocitos expresan varios tipos de receptores a las integrinas. Las integrinas espermáticas pueden unirse a OPN en el fluido oviductal, dado que la OPN está presente también en el oviducto y puede sintetizarse por células epiteliales oviductales (Gabler *et al.*, 2003). Más aún, el complejo espermatozoide-integrina-OPN tiene el potencial de unirse a otras OPN con alta afinidad.

Otra posibilidad de interacción de la OPN es con la CD44, glicoproteína presente en el espermatozoide del toro (Bains *et al.*, 2002) y el ovocito (Schoenfelder y Einspanier, 2003). La CD44 pertenece a la familia del ácido hialurónico. La OPN participa en el evento unión espermatozoide-ovocito, formando una fuerte malla para entrelazarse. Aparentemente la OPN afecta la proporción de desarrollo de embriones en los estados tempranos. El efecto de la OPN ocurre después de la unión espermatozoide-ovocito. La expresión de la OPN se observa en ambos, plasma seminal y fluido oviductal. La disponibilidad de la OPN en el oviducto,

donde ocurre la fecundación, podría garantizar la acción de la integrina y saturar el receptor CD44 sobre la superficie del espermatozoide, maximizando la posibilidad de fijarse al ovocito. Es posible que también se secreta en el lumen del oviducto afectando a los ovocitos antes de que entren en contacto con el espermatozoide (Figura 15).

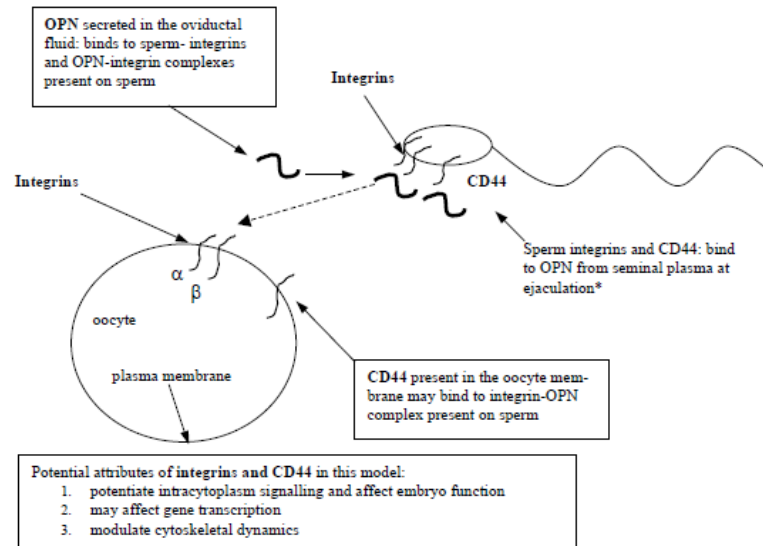


Figura 15. Modelo sugerido por Moura 2005, para explicar la interacción de la OPN con el espermatozoide eyaculado y el ovocito.

Moura *et al.* (2007b) reportaron en toros Holstein la relación de la OPN en la penetración de espermatozoides al ovocito y la prevención de la polispermia en toros (Erikson *et al.*, 2007). De igual manera, la OPN se relaciona positivamente con la viabilidad espermática posiblemente por el bloqueo de vías apoptóticas y aparentemente con la capacitación de los espermatozoides de toro a través de mecanismos indeterminados (Erikson *et al.*, 2007).

IV.5.1.7. Clusterina.

La clusterina es una proteína de origen testicular y epididimal. Es una glicoproteína con dos sitios de unión a la heparina. En el toro es abundante en el hígado, cerebro y testículo. También está presente en plasma seminal y superficie de la células espermáticas de toro, hombre, y está involucrada en procesos de agrupamiento, adhesión celular y maduración espermática. Considerando su localización en el espermatozoide y su rol de transportador de lípidos esta proteína puede tener funciones biológicas similares a las mencionadas para BSP en cuanto a la función de protección de la membrana espermática durante la criopreservación (Jobim *et al.*, 2004). Pero contradictoriamente, presenta una relación inversa con la fertilidad

(Ibrahim *et al.*, 2000). Por ello, su presencia en el semen del toro es un marcador potencial de semen de baja calidad (Ibrahim *et al.*, 2000, Jobim *et al.*, 2009).

Está implicada en el mecanismo de captura de espermatozoides anormales de toro y carnero, por lo que los niveles de Clusterina en el semen están asociados con presencia de espermatozoides morfológicamente anormales y se relaciona negativamente con la motilidad espermática e índices de fertilidad, incluida la tasa de no retorno. Se une a espermatozoides anormales provocando su aglutinación (Ibrahim 1999, Ibrahim *et al.*, 2000, Jobim *et al.*, 2009).

Se expresa como respuesta al choque térmico y estrés oxidativo, debido a que las células de Sertoli y epiteliales del epidídimo aumentan su producción y su unión a espermatozoides anormales, posiblemente para aminorar la desnaturalización y la estabilización de proteínas de la membrana celular. Previene el daño por estrés oxidativo del espermatozoide (Reyes-Moreno *et al.*, 2002) y actúa como chaperona protegiendo el espermatozoide de efectos tóxicos de la precipitación de proteínas (Moura *et al.*, 2006a; Reyes-Moreno *et al.*, 2002) Se ha detectado en espermatozoides de diversas especies, con anomalías morfológicas y se ha descrito que una espermiogénesis anormal es la causa de un aumento del número de células que contienen esta proteína (Ibrahim 2001a). Tiene potente actividad chaperona, similar a la de pequeñas proteínas del choque térmico, protegiendo a los espermatozoides de efectos tóxicos por precipitación de proteínas.

IV.5.1.8. Proteína Prostaglandina D- sintetasa tipo Lipocalina (PDGS) (SP26).

Proteína del plasma seminal, con peso molecular 26 kDa, pl 6.2, (Gerena *et al.*, 2000), está presente en toros con altas tasas de fertilidad, valorados *in vivo* (Killian *et al.*, 1993, Gerena *et al.*, 1998). Sin embargo existe un hallazgo contradictorio con tres isoformas de PDGS en fluido epididimario, donde se expresaron ampliamente en toros de baja fertilidad (Moura *et al.*, 2006b).

Es la principal proteína secretada por las células epiteliales del epidídimo, aislada en plasma seminal, líquido de la cola del epidídimo y células de Sertoli, lo que sugiere alguna relación con la maduración espermática. Se ubica en la región apical del acrosoma del espermatozoide eyaculado (Gerena *et al.*, 2000).

La PDGS realiza un importante papel en el ciclo espermatogénico en la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo (Mortarino *et al.*, 1998). Pero contrariamente, Moura *et al.* (2006b) encontraron 3 isoformas de esta proteína en fluido epididimario aumentada en toros de baja fertilidad, posiblemente, porque las proteínas del fluido de las glándulas accesorias pueden modificar estas isoformas durante la eyaculación

Estudios con anticuerpos contra PGDS resultaron en disminución de tasas de fecundación *in vitro* de embriones (Gonçalves *et al.*, 2007), lo que resalta su relación positiva con la fertilidad. Constituye <0.1% del total de proteínas del plasma seminal de toros, es decir, aproximadamente 100 µg/ml de plasma. La concentración igualmente depende de la frecuencia de recolecta del plasma, encontrándose niveles insignificantes en el tercer eyaculado (Gerena *et al.*, 1998).

Es la proteína más predominante en el plasma seminal de toros de alta fertilidad Su presencia es 3.5 veces mayor, en toros de alta fertilidad (Killian *et al.*, 1993, Gerena *et al.*, 1998), pero constituye menos del 0.1% del total de proteínas del plasma seminal. Tiene correlación positiva con motilidad espermática en el hombre (Souza *et al.*, 2012), presenta un importante rol en el ciclo espermatozoide teratogénico y en la maduración de espermatozoides en el epidídimo.

IV.5.1.9. Caltrina (Calcium transport inhibitor)

Proteína de 6 kDa, es un péptido aislado del fluido seminal (Tannert *et al.*, 2007). Identificada en cobaya, rata, ratón y toro, se localiza sobre el acrosoma del espermatozoide e inhibe la actividad de la acrosina en la exocitosis (Winnica, *et al.*, 2000), así como la adquisición de Ca²⁺ por parte de espermatozoides epididimales en la especie bovina.

IV.5.2. Predicción de la fertilidad del toro basada en la proteómica

En los últimos años, la proteómica ha sido empleada para identificar el perfil de proteínas de toros de alta y baja fertilidad, de tal manera que se puede emplear en la búsqueda de biomarcadores de fertilidad (Kumar *et al.*, 2012).

En diversos trabajos mediante el procedimiento de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE), se ha demostrado que el plasma seminal del toro contiene proteínas asociadas positiva o negativamente con la fertilidad de los toros, las cuales son marcadoras y de valor para predecir su fertilidad. Adicionalmente a estas proteínas marcadoras de fertilidad, también se han detectado numerosas enzimas y proteasas inhibitorias de la fertilidad en plasma seminal (Sullivan *et al.*, 2004) de humanos y animales.

La predicción de la fertilidad por medio de proteínas biomarcadoras se puede determinar en diferentes etapas del proceso reproductivo, y puede estar influenciada por diferentes grupos de proteínas. A continuación se describen las principales.

IV.5.2.1. Proteínas asociadas a la alta y baja fertilidad

Dentro de las proteínas asociadas a la fertilidad, el antígeno asociado a la fertilidad (FAA) es una proteína de 31 kDa, de unión a la heparina (HBP, Bellin *et al.*, 1998, Miller *et al.*, 1990, Peddinti *et al.*, 2008) cuya presencia ha sido asociada con toros de alta fertilidad (Moura *et al.*, 2006a, McCauley *et al.*, 2004) Esta proteína es detectada en vesículas seminales, próstata, glándulas accesorias y membrana espermática, y es reconocida por ser un marcador de fertilidad (Spratt, *et al.*, 2000).

En fluidos de la cola del epidídimo, la fucosidasa y la catepsina D son las más predominantes 82.3 y 2.4 veces mayor en toros de alta fertilidad ($P < 0.05$) que en toros de baja fertilidad, respectivamente (Moura *et al.*, 2006b). Por el contrario, isoformas de prostaglandina D sintetasa (PGDS, 24–27 kd, pl 6.3–5.8) fueron de 3.2 a 2.2 veces mayores en toros de baja fertilidad ($P < 0.05$).

Múltiples proteínas de unión a la heparina (HBP) forman complejos de diferente afinidad por la heparina. La de mayor afinidad es el complejo HBP de 21-30 kDa (HBP-21.5, HBP-24 y HBP-30), pero no es el más potente para los procesos de capacitación y reacción acrosómica, como sí lo es la HBP-B5 (Miller y Winner, 1990). La determinación de la presencia de este complejo en membrana espermática incrementó la fertilidad de 9 a 40% en ganado de carne Angus rojo, Gelbvieh, Santa Gertrudis y sus cruces (Bellin *et al.*, 1998).

Los sitios de unión a heparina de espermatozoides bovinos y equinos se visualizan en mayor cantidad cuando son expuestos al plasma seminal que en los espermatozoides de la cola del epidídimo que no han sido expuestos a secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Heise *et al.* (2010) observaron incremento de las tasas de preñez por los espermatozoides epididimales expuestos a plasma seminal. En équidos, las membranas plasmáticas de espermatozoides expuestos al plasma seminal *in vivo* o *in vitro* contienen una serie de proteínas ácidas de 15-17 kDa que no se encuentran en la cola del epidídimo y estas proteínas se encuentran unidas a la heparina (Thérien *et al.*, 2001).

La albúmina es otra proteína que se une al espermatozoide y puede también influenciar la capacitación a través de la habilidad de modular el colesterol de la membrana (Visconti y Kopf, 1998). Es posible que la alta expresión de la albúmina que puede mostrar actividad fosfolipasa junto a las BSP A1/A2 en el AGF de toros de alta fertilidad mejore la capacitación y reacción acrosómica facilitando la penetración por parte del espermatozoide (Singleton y Killian 1983). La albúmina en humanos absorbe peróxidos lipídicos, contribuyendo como protectora de la membrana espermática (Alvarez y Storey, 1995, Visconti y Kopf, 1998).

Revisión bibliográfica

Gaviraghi *et al.*, 2010) compararon el perfil proteómico 2D de espermatozoides de toros de alta y baja fertilidad. El estudio evidenció la expresión de varias proteínas relacionadas directamente con los niveles de fertilidad ($p < 0.05$). Estas proteínas están involucradas en las interacciones espermatozoide-ovocito. Los espermatozoides de alta y baja fertilidad se diferencian por cuatro principales características consecuentes con mayor expresión de proteínas relacionadas con: metabolismo energético, comunicación celular, espermatogénesis y motilidad celular (Peddinti, *et al.*, 2008).

Kelly *et al.* (2006) indicaron que 33 proteínas con componentes mayores y menores de las BSP han sido correlacionadas positiva o negativamente con la fertilidad de toros, entre otras: aSFP (acid seminal fluid protein), BSP A-3, PDC-109, BSP 30 kDa, clusterina, desoxirribonucleasa gamma, glutation peroxidasa, inhibidor 2 de metaloproteinasa, osteopontina, prostaglandina, espermadhesina Z13 y superóxido dismutasa (Nauc, y Manjunath 2000, Gerena, *et al.*, 1998, Cancel *et al.*, 1997, Moura, 2006a)

En 1993, Killian *et al.* reportaron la presencia de 4 proteínas en plasma seminal del toro asociadas a la fertilidad. Mediante electroforesis 2D-PAGE en plasma seminal se identificaron 2 proteínas con peso molecular de 26 kDa y 55 kDa y pI de 6.2 y 4.5 respectivamente, en toros de alta fertilidad; mientras que, dos proteínas de 16 kDa (pI 4.1) y 16 kDa (pI 6.7) se presentaron de forma importante en toros de baja fertilidad. Estas últimas proteínas pueden ser factores de antifertilidad del plasma seminal, que incluyen factores de decapacitación descritos en varias especies: en humanos, human antifertility factor 1 (AF1), en conejos el factor estabilizante del acrosoma (ASF) y en toros plasma seminal (SPLN). Estos factores inhiben la capacitación espermática, la reacción acrosómica o enzimas acrosomales, que finalmente interfieren con la fecundación.

En el fluido de las glándulas sexuales accesorias de toros con altos porcentajes de fertilidad se encontraron grandes cantidades de Osteopontina (OPN) y Fosfolipasa A2 (PLA2) respecto a toros de menor fertilidad, por lo que la PLA2 es considerada como un posible marcador de fertilidad (Moura, 2005, Erikson, *et al.*, 2007). La PLA2 está presente en la membrana plasmática de toros y está relacionada con eventos de la reacción acrosómica, fusión espermática (Yuan *et al.*, 2003) y motilidad espermática (Bao *et al.*, 2004), pero no se encuentra en el espermatozoide epididimal, lo que demuestra que algunas fosfolipasas son adsorbidas del plasma seminal a la superficie del espermatozoide (Breitbart y Spungin 1997).

Para el caso de las BSP, las isoformas de BSP 30 kDa han sido relacionadas con toros de alta fertilidad *in vivo*, posiblemente por su capacidad de actuar en la capacitación espermática (Moura *et al.*, 2006a). Contrariamente Roncoletta *et al.*, (2006) reportan mayores cantidades de esta proteína, de 14.5 kDa y pI 4,5, en toros de baja fertilidad.

Revisión bibliográfica

Estudios en toros de baja fertilidad demostraron que se mejoró la habilidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo para penetrar ovocitos libres de zona, cuando estos espermatozoides fueron tratados con fluido de las glándulas sexuales accesorias (AGF) provenientes de toros de comprobada alta fertilidad. Así mismo cuando los espermatozoides se trataron con fluido de las AGF proveniente de toros de baja fertilidad, el efecto fue contrario al anterior (Moura *et al.*, 2007).

En otro estudio se evidenció que la penetración de ovocitos libres de zona por espermatozoides eyaculados de toros de baja fertilidad, mejoró un poco cuando se utilizó plasma seminal de toros de alta fertilidad, pero la penetración por espermatozoides de alta fertilidad fue disminuida por exposición a plasma seminal de toros de baja fertilidad (Moura *et al.*, 2007b).

De otra parte, el plasma seminal de toros de baja fertilidad afectó la habilidad de penetración de espermatozoides de alta y baja fertilidad, cuando el plasma seminal usado era ajeno a los espermatozoides que se estaban probando (Henault, *et al.*, 1996).

Las secreciones de las glándulas sexuales accesorias son capaces de mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides de toros recolectados de la cola del epidídimo (Henault *et al.*, 1995). Las funciones del espermatozoide pueden verse afectadas por proteínas del plasma seminal, incluyendo la capacitación y reacción acrosómica (Manjunath y Thérien, 2002), la motilidad e integridad del DNA (Chen *et al.*, 2002) y la interacción con el ovocito (Yuan *et al.*, 2003).

En toros, la BSP-A3, proteína relacionada con baja fertilidad (Killian *et al.*, 1993) con pm de 14.5 kDa y pl 4,5 fue 2.5 veces mayor en toros de baja fertilidad (Roncoletta *et al.*, 2006).

Similar a lo que ocurre con los toros, Novak *et al.* (2010) identificaron en sementales cuatro proteínas del plasma seminal que presentaron relación negativa con la fertilidad: calicreína-1E2 (KLK2), clusterina y las proteínas del plasma seminal SP1 y SP2. De manera opuesta, la proteína rica en cisteína secretora 3 (CRISP3) se relaciona positivamente con la tasa de concepción ($r = 0,495$, $P = 0,027$), por lo que puede considerarse como un buen marcador de la fertilidad en equinos.

La nucleobindina, proteína con pm de 58 kDa y pl 5.6, está inversamente relacionada con la fertilidad. Moura *et al.*(2007b) reportaron niveles bajos de nucleobindina en el fluido de las glándulas accesorias (AGF) de toros de alta fertilidad (Figura 16).

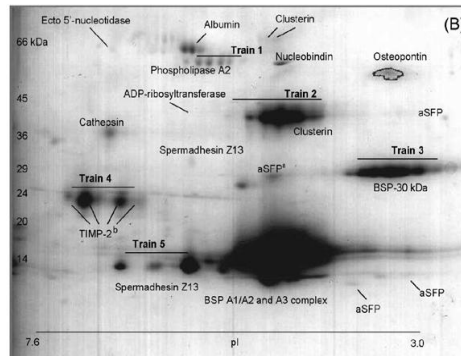


Figura 16. Mapa electroforético de Proteínas del fluido de las glándulas sexuales accesorias (AGF) en ganado lechero (*Bos Taurus*), separadas por SDS-2D PAGE, asociadas con la capacidad de penetración de ovocitos por espermatozoides de la cola del epidídimo. Tomado de Moura *et al.* (2007b).

Starita-Geribaldi *et al.* (2001), en un estudio humano, compararon la expresión de pol péptidos en hombres fértiles e infértiles, evidenciándose que ciertos grupos de polipéptidos desaparecieron en el mapa proteómico de hombres infértiles por diversas alteraciones o en hombres vasectomizados. En humanos, se han sugerido principalmente tres proteínas relacionadas con la fertilidad: a. La Lactato deshidrogenada C-4 (LDH-C4), encontrada en plasma seminal y originada principalmente por el daño de células espermáticas que se emplea como marcador para valorar los túbulos seminíferos. b. La inhibina B, considerada como marcador funcional del estado de las células de Sertoli, cuyos niveles en suero sirven para diagnosticar azoospermia. c. Hormona antimulleriana, cuya presencia en el plasma seminal refleja una espermiogénesis funcional (Starita-Geribaldi *et al.*, 2001).

En la figura 17, se registran de igual forma la información de las proteínas AGF del toro Cebú Nellore.

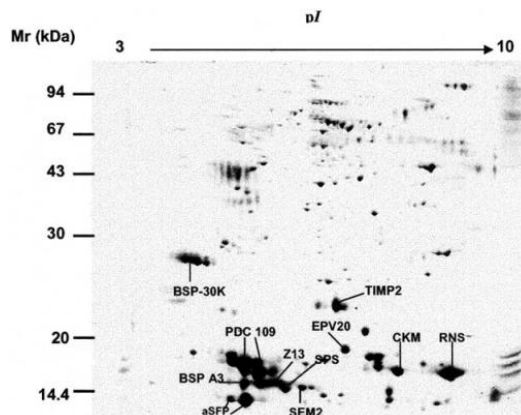


Figura 17. Mapa electroforético de Proteínas del fluido de las glándulas sexuales accesorias (AGF) de toros Nellore (Assumpção *et al.*, 2005).

Revisión bibliográfica

El efecto del AGF de toros de alta fertilidad sobre espermatozoides epididimales es probablemente el resultado de proteínas específicas expresadas en el fluido de las glándulas sexuales accesorias (Moura *et al.*, 2007a).

Resultados previos demuestran el uso potencial de las proteínas marcadoras de fertilidad como un método de diferenciación de la fertilidad de los toros y de la facilidad de congelación del semen. La facilidad de congelación podría ser un indicador indirecto de fertilidad en toros. En este sentido, los estudios de Cancel *et al.* (1997), Gerena *et al.* (1998, 2000), Moura *et al.* (2005) y Jobim *et al.* (2004), mediante electroforesis 2D-PAGE identificaron en plasma seminal de toros, proteínas que predominaron para alta o baja congelabilidad del semen, y encontraron que 4 proteínas de 15–16 kDa; pI 4.7–5.2, 11–12 kDa; pI 4.8–4.9, 13–14 kDa; pI 4.0–4.5 y 20–22 kDa; pI 4.8–5.2, corresponden a aSFP y Clusterina, y presentaron mayor concentración ($P < 0.05$) en plasma seminal de toros con mayor facilidad de congelación, mientras que la proteína de 25–26 kDa y pI 6.0–6.5 fue más abundante en muestras de plasma seminal de toros de baja facilidad de congelación. Los resultados señalan a la aSFP y la Clusterina, como marcadoras de congelabilidad del semen (Jobim, *et al.*, 2004). Así mismo, las grandes cantidades de BSP que se observan en muestras de toros de fácil congelación pueden proveer protección a las membranas de los espermatozoides durante procedimientos de congelación de semen.

El punto de 25–26 kDa y pI 6.0–6.5 puede corresponder a la prostaglandina D sintetasa, tipo lipocalina (PGDS), relacionada con alta fertilidad del toro (Killian, *et al.*, 1993) y la fácil congelación del semen (Roncoletta, *et al.*, 2000). Pero este estudio difiere de otros ya que estuvo presente en el 100% de los toros de baja fertilidad y sólo en 30% de toros de alta fertilidad. Por el contrario, Roncoletta *et al.* (2000), encontraron 40% más de esta proteína en toros de alta fertilidad y con mayor congelabilidad y le atribuyeron a PGDS la capacidad de participar en modificaciones de permeabilidad de la membrana celular. Este hallazgo puede ser debido a que en la electroforesis 1D, proteínas de diferentes puntos isoeléctricos pueden tener el mismo peso molecular.

Estudios posteriores de Jobim *et al.* (2009) señalan además a la Albúmina y Osteopontina como proteínas que se relacionaron con mejor congelabilidad del semen y de manera opuesta, la proteína P25b, que muestra actividad anticongelante (AFPs), es una proteína espermática de origen epididimario, considerada marcador de fertilidad bovina, asociada con la membrana plasmática. Bajos niveles de esta proteína están asociados con subfertilidad en toros. Esta proteína aparecía asociada con vesículas membranosas que incrementan en cantidad a lo largo del epidídimo. Esta proteína parece ser un marcador de maduración epididimaria en toros (Frenette y Sullivan 2001).

Cardozo *et al.* (2009) reportaron en óvidos mejora significativa ($p < 0.05$) en la integridad, motilidad y viabilidad espermática, evidenciada en el aumento de la calidad espermática de

muestras seminales descongeladas cuando se adicionaron proteínas específicas del plasma seminal al medio de criopreservación. Entre las proteínas relacionadas con la motilidad se reportan: BSP A1/A2 (Sanchez-Luengo *et al.*, 2004); aSFP (Schoneck *et al.*, 1996); Fosfolipasa A2 (PLA 2, Bao *et al.*, 2004) y Espermadhesina Z13.

El trabajo de Killian *et al.* (1993) ha dado lugar a un modelo de regresión para predecir la fertilidad de los toros asociando las proteínas de mayor presentación en toros de mala o buena fertilidad, con un valor de R= 0,89 (Ax, 2008)

En la actualidad, existen compañías comerciales que tienen pruebas que permiten identificar, como en los test de embarazo casero, cambios de color en la muestra como indicativo de la presencia o ausencia de alguna de estas proteínas marcadoras de la fertilidad en muestras seminales. Por ejemplo la presencia de antígeno asociado a la fertilidad FAA, en plasma seminal indicaría que ese toro debería presentar mayores índices de fertilidad (McCauley, *et al.*, 2004).

IV.5.2.2. Proteínas relacionadas con la Reacción Acrosómica e interacción espermatozoide-ovocito

Entre las proteínas relacionadas (Figura 18), se reporta las fosfolipasa A2 (PLA2) (Yuan *et al.*, 2003). La Osteopontina (OPN) está relacionada con desarrollo embrionario temprano (Moura *et al.*, 2006a).

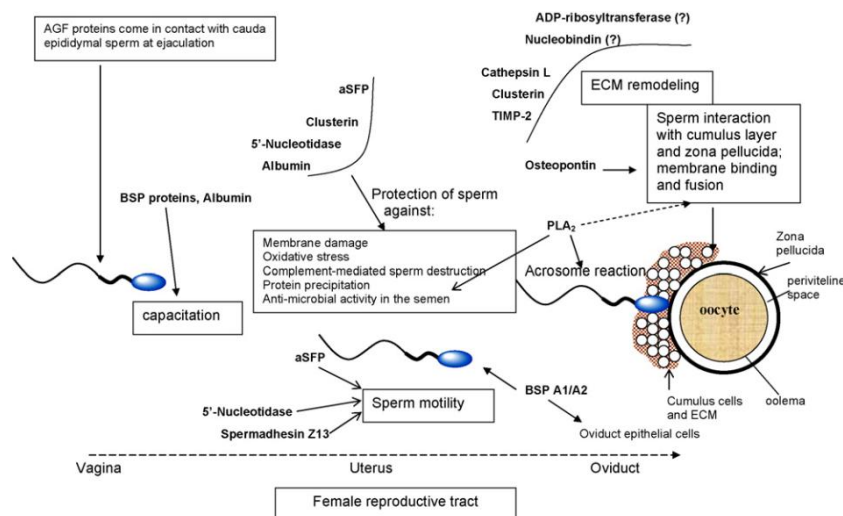


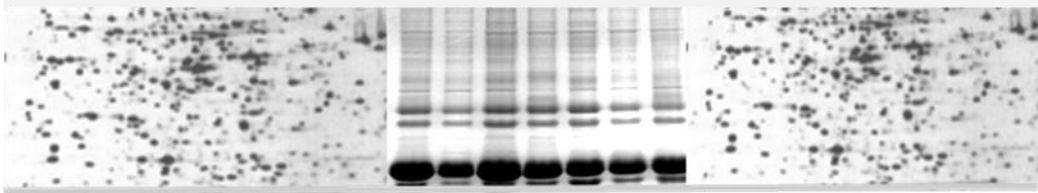
Figura 18: Diagrama de aspectos de fisiología espermática y fecundación, que son potencialmente influenciados por las proteínas identificadas en AGF en toros Holstein (tomado de Moura *et al.*, 2007).

Revisión bibliográfica

En la figura 18 se puede apreciar que después de la eyaculación, la unión de las proteínas BSP y la albúmina, contribuyen a la capacitación, y a nivel del tracto reproductivo femenino, la protección de los espermatozoides podría estar mediada por proteínas AGF como la aSFP, clusterina, 5-nucleotidasa y la albúmina. Por otra parte, cuando el espermatozoide entra en contacto con la capa del *cumulus*, la interacción y remodelación con la matriz extracelular (ECM) pueden ser muy importantes.

La PLA2 secretada por las AGF actúa durante la reacción acrosómica y la fusión de membranas y se ha reportado su actividad antimicrobiana. La interacción espermatozoide-ovocito también involucra la Osteopontina. La motilidad espermática es indispensable para que ocurra la fecundación *in vivo* y puede ser afectada por aSFP, espermadhesina Z13 y 5-nucleotidasa. Las funciones de nucleobindina y ADP ribosiltransferasa, dos nuevas proteínas detectadas en la AGF, están en estudio (Moura *et al.* (2007).

V. MATERIAL Y MÉTODOS



V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó en el Centro de investigaciones la Libertad de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA (Figura 19), localizado en el municipio de Villavicencio del departamento del Meta- Colombia, ubicado bajo las coordenadas: 4.05788904164-73.4670889746 (Km 17 vía Puerto López, Meta). Su altura sobre el nivel del mar es de 336 m, con temperatura promedio de 28°C que varía bruscamente durante las 24 horas del día y entre la época de lluvias (23.6°C) y la época seca (28.5°C). La humedad relativa es de 80-85% en la época de lluvias y de 50 a 55% en la época seca, variables climáticas que integradas por el índice de temperatura/humedad representan valores para las dos época de 71.0 y 79.1 respectivamente. La precipitación pluviométrica está entre 3000 y 3500 mm/año. Estas características según la clasificación de Holdrige la determinan como bosque húmedo tropical.



Figura 19. Panorámica del centro de investigaciones la Libertad de CORPOICA

V.2. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado para los experimentos se obtuvo de 14 machos *Bos taurus* y *Bos indicus* de las razas San Martinero y Cebú Brahman (Figuras 20 y 21), en etapa reproductiva, con edades promedio de 3 años, mantenidos en buen estado de salud y alimentados en pastoreo rotacional con pasturas de *Brachiaria Decumbens* y sal mineral, y de tractos reproductivos de vacas sacrificadas en una planta de beneficio local (Frigoriente del Meta, en Villavicencio).



Figura 20. Toros reproductores de la raza San Martinero. (Animales experimentales)



Figura 21. Toros reproductores de la raza Cebú. (Animales experimentales)

V.3. REACTIVOS QUÍMICOS

Los reactivos químicos empleados en los procesos experimentales de evaluación de eficiencia reproductiva, criopreservación, producción *in vitro* de embriones y electroforesis fueron como mínimo de calidad para análisis (PA) y salvo que se indique lo contrario marca Sigma Aldrich.

V.3.1. Reactivos y Medios empleados para electroforesis

Para la electroforesis se emplearon:

Materiales y Métodos

- Tiras de poliacrilamida con pH (3-10) inmovilizado (IPGs), aceite mineral Bio-Rad, etanol, metanol, glicina y ácido acético de Merck y úrea del laboratorio Carlo Erba.
- Geles de Poliacrilamida: Los geles se prepararon a partir de acrilamida al 30%, Tris-Base 1.38M, EDTA 0.5M, Dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%, Tetrametilen etilen diamina (TEMED) como catalizador y Persulfato de amonio (APS) al 10% como iniciador.
- Solución de tinción: Para la tinción se utilizó azul de Coomasie al 0.025%, metanol y ácido acético glacial.
- Solución decolorante: Estuvo compuesta de metanol al 30% y ácido acético glacial al 10%.
- Tampón de cubetas: El tampón de cubetas se compuso de SDS al 0.1%, Glicina 192 mM y Tris 25 mM.
- Tampón para rehidratación de tiras: Este tampón estaba compuesto por Urea 8M, Tributyl fosfina (TBP) 2mM, CHAPS al 4%, Ampholytes al 0.2% (pH 3-10) y azul de bromofenol al 0.0002%.
- Tampón de corrida 1D: Compuesto por azul de bromofenol al 1%, SDS al 2%, TRIS 0.027 M, EDTA al 0.0018 y glicerol al 25%.
- Medios de equilibrio de las tiras IPGs: Este procedimiento se realiza en dos fases, en ambas, el tampón está compuesto por SDS al 2%, urea 6M, Tris 0.375M (pH 8.8) y 20% de glicerol. La diferencia entre las dos partes la constituyen los ingredientes que se adicionan. En la primera fase (buffer I) al stock se adiciona 2% (w/v) de DTT, mientras que en la segunda fase (buffer II) se adiciona Iodoacetamida al 2.5 % (w/v).

V.3.2. Reactivos y Medios para procesos *in vitro* de producción de embriones bovinos

Para la producción *in vitro* de embriones se emplearon reactivos para cultivo celular (CT) y testados para embriones (embryo tested ET) marca Sigma®.

Los medios empleados para transporte de ovarios, colecta, maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo embrionario, se prepararon bajo cabina de flujo laminar. Para los medios

Materiales y Métodos

de maduración, fecundación y desarrollo embrionario se utilizó agua para transferencia de embriones Sigma®.

Para los demás medios se utilizó agua ultrapura desionizada a 18.2 megahoms-cm. Todos los medios se filtraron a través de membranas de 0.22 µm, y se almacenaron a -120 °C hasta su utilización.

- Se empleó suero fetal bovino (SFB) marca Gibco®, el cual se inactivó por calentamiento a 56°C por 30 minutos. Posteriormente se sometió a doble filtración, en una primera instancia con membrana de 0.8 µm, y luego con membrana de 0.22 µm y finalmente se alicuotó y almacenó en ultra congelador a -120°C.
- Medio de transporte de los ovarios: El medio estuvo constituido por solución salina fisiológica, suplementado con penicilina y estreptomycin (Tabla 1.)

Tabla 1. Concentración de los componentes del medio de transporte de ovarios

Componentes	Concentración
Solución salina fisiológica 0,9%	1 litro
Penicilina	10.000 UI/mL
Estreptomycin	500 mg/L

- Medio para colecta de ovocitos: Compuesto por (medio de cultivo tisular) TCM 199 con sales de Hanks, HEPES 10M, suero fetal bovino, Penicilina-Estreptomycin y Anfotericina. El medio se filtró a través de una membrana de 0.22 µm (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de los componentes del medio para colecta de ovocitos

Componentes	Concentración
Medio TCM 199 modificado con sales de Hanks, L glutamina, rojo fenol y bicarbonato (M-0393)	10.600mg/L
HEPES 1M	10 mM
Suero fetal bovino (SFB)	5 %
Penicilina-Estreptomycin	10.000 UI/mL
Anfotericina	10 mg/mL

Materiales y Métodos

- Medio para maduración de ovocitos: Compuesto por TCM 199 con Bicarbonato, se suplementó y equilibró 8 horas antes de su uso con: SFB, Penicilina-Estreptomocina, Anfotericina, Factor epidermal de crecimiento (EGF), piruvato de sodio y L-Glutamina, en incubador con atmósfera humidificada a 38.5 °C y 5% de CO₂ (Edwards y Hansen 1996). (Tabla 3.)

Tabla 3. Concentración de los componentes del medio para maduración de ovocito

Componentes	Concentración
M199 con L-Glutamina y sales de Earle y bicarbonato (M-0393).	9.800 mg/L
NaHCO ₃ (S-5761).	26.2 mM
Suero fetal bovino (SFB)	10 %
Penicilina-Estreptomocina	10.000 UI/mL
Anfotericina	10 mg/mL

- Medio para capacitación espermática: Se utilizó el medio Sperm-Talp, como lo describen Parrish *et al.* (1988), suplementado con Albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, Penicilina-estreptomocina y Piruvato, equilibrado 8 horas antes de su uso en incubador con atmósfera humidificada a 38.5 °C y 5% de CO₂. La selección y lavado de los espermatozoides se realizó por centrifugaciones en gradiente de Percoll® 90% y 45% en Sperm-Talp (Tabla 4, 5 y 6).

Tabla 4. Concentración de los componentes del medio Sperm-Talp Stock para procesos de capacitación espermática.

Componentes	Concentración
NaCl (S-5888)	100 mM
KCl (P-5405)	3.2 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (S-9638)	0.3 mM
Ácido láctico (L-7900)	21.5 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O (C-7902)	2 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O (M-2393)	0.4 mM
HEPES (H-6147)	10 mM
NaHCO ₃ (S-5761)	25 mM

Tabla 5. Medio Sperm-Talp-suplementado

Componentes	Concentración
Medio Sperm-TL Stock	50 ml
BSA (A-3311)	6 mg/mL
Piruvato de sodio Stock	1 mM
Penicilina/Estreptomicina	10.000 UI/mL

Tabla 6. Concentración de los componentes del gradiente de Percoll para procesos de capacitación espermática.

Percoll 90%	
10X Sp-TL-STOCK Componentes	Concentración
NaCl (S-5888)	799'96 mM
KCl (P-5405)	30'85 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (S-9638)	28'98 mM
HEPES (H-6147)	99'87 mM
Percoll 90% (200 mL)	
Componentes	Concentración
10X Sp-TL Stock	20 mL
NaHCO ₃ (S-5761)	25 mM
Ácido láctico (L-7900)	43'57 mM
Percoll (P-4937)	180'00 mL
MgCL ₂ 6H ₂ O de stock 0.1M (M-2393)	0'395 mM
CaCl ₂ de stock 1M (S-5761)	1'95 mM

Materiales y Métodos

- Medio para fecundación *in vitro* (FIV): Para el procedimiento de fecundación *in vitro* (FIV) se empleó el medio TALP (Tyrode albumin lactate pyruvate) modificado (Parrish *et al.*, 1986) suplementado con medio para fecundación *in vitro* (medio FIV), albúmina sérica bovina (BSA), penicilina-estreptomicina, piruvato de sodio y heparina (Parrish *et al.*, 1988).

Este medio fue suplementado ocho horas antes de su uso con heparina y 30 minutos antes de la inseminación con penicilamina-hipotaurina y epinefrina (PHE) (Parrish *et al.*, 1986) y se equilibró en incubador con atmósfera humidificada a 38.5 °C, y 5% de CO₂ (Tabla 7, 8, 9 y 10).

Tabla 7. Concentración de los componentes del medio de FIV–Stock para procesos de fecundación.

Medio de fecundación	
Medio FIV-Stock	
Componentes	Concentración
NaCl (S-5888)	114 mM
KCl (P-5405)	3.2 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O (S-9638)	0.3 mM
Ácido láctico (L-7900)	10 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O (C-7902)	2 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O (M-2393)	0.5 mM
NaHCO ₃ (S-5761)	25 mM

Tabla 8. Medio FIV-Talp

Componentes	Concentración
Medio FIV Stock	50mL
BSA FAF (A-8806)	6 mg/mL
Piruvato de sodio Stock	0.2 mM
Penicilina-Estreptomicina	10.000UI/mL

Tabla 9. Medio FIV-Talp suplementado

Componentes	Concentración
Penicilamina-Hipotaurina-Epinefrina – PHE	25 µL / pocillo
Heparina Stock	1.75 UI/mL

Tabla 10. Concentración de los componentes del penicillamine - hypotaurina y epinefrina (PHE) usada en el medio de fecundación *in vitro*

PHE	
Sol A :1 mM Hypotaurina (10mL)	
Componentes	Concentración
Solución Salina	10 mL
Hipotaurina (H-1384)	1 mM
Sol B: 2mM Penicillamine (10mL).	
Componentes	Concentración
Solución Salina	10 mL
Penicillamina (P-5000)	99'87 mM
Sol C : Lactato de sodio metabisulfito de sodio (50mL)	
Componentes	Concentración
Ácido láctico (L-7900)	29'43 mM
Metabisulfito de sodio (S1516)	5'29 mM
PBS	50 mL
Sol D:µM Epinefrina (40mL)	
Componentes	Concentración
Solución C	40 mL
Epinefrina (E-4250)	0'25 mg
10 mL de soluciónA+ 10mL soluciónB + 4 mL de soluciónD + 16 mL de PBS	

Materiales y Métodos

- Medio para cultivo embrionario: El medio empleado fue SOF (Fluido oviductal sintético, (Tervit *et al.*, 1972, Gardner *et al.*, 1994, Holm *et al.*, 1999) suplementado con 5% de FBS y equilibrado ocho horas antes de su uso en placas de 4 pocillos Nunc® en incubador con atmósfera humidificada a 38.5 °C, y 5% de CO₂. Se trabajó en microgotas de 50 µL recubiertas por aceite mineral (Tabla 11).

Tabla 11. Concentraciones de los componentes del medio para cultivo embrionario fluido oviductal sintético (SOF)

Medio SOF stock	
SOF stock A	Concentración g/mol
Componentes	
Na Cl (g)	58.44
KH ₂ PO ₄ (g)	136.1
KCl (g)	74.55
MgSO ₄ 7H ₂ O (g)	120.4
Lactato de Sodio (ml)	112.1
Cada uno de los medios stocks se filtró en membrana de 0.22 µm	
SOF stock B (solución bicarbonato)	Concentración g/mol
Componentes	
NaHCO ₃ (g)	84.01
Rojo de fenol	376.40
SOF stock C (solución piruvato)	Concentración g/mol
Componentes	
Piruvato de sodio (g)	110.0
	Concentración g/mol
SOF stock D (solución cloruro de calcio)	
Componentes	
CaCl ₂ 2H ₂ O	147.0
MEDIO SOF FINAL	Concentración mL

Componentes	
Agua	78
Citrato de sodio tribásico	0.01
Myo-inositol	0.050
SOF- Stock A	10
SOF- Stock B	10
SOF- Stock C	1
SOF- Stock D	1
BME 50x	3
MEM 100x	1
Glutamina 200 Mm	0.1
Gentamicina	0.5
SFB	5%

- Medio para tinción de ovocitos: Para valorar los resultados del proceso de fecundación *in vitro*, previo al proceso de tinción, se denudaron los ovocitos en medio compuesto por 150 µL de hialuronidasa (0.1 mg/mL) y 350 µL de Solución salina tampón fosfato de Dulbecco (DPBS). Posteriormente se transfirieron a medio de fijación constituido por glutaraldehído al 0.5% en DPBS y más tarde se a medio de tinción a base de Hoechst 3342 (1mg/ml) en DPBS con 1% de alcohol de polivinilo (PVA).

V.3.3. Reactivos y Medios para congelación del semen

El medio de congelación empleado a base de Citrato Fructosa estuvo conformado para un volumen de 1000 ml de agua ultra pura (UP), Citrato de sodio 29g, Fructuosa 12.5g, Penicilina 500UI y Estreptomina 1 mg. De este medio base se prepararon dos diluyentes (A y B):

Diluyente A: Citrato: fructosa 80% y yema de huevo 20%. Conservación a 2°C

Diluyente B: Diluyente A 86% y Glicerol 14%. Conservación a 2°C.

V.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

V.4.1. Obtención de muestras seminales

Se colectaron para cada raza (San Martinero y Cebú Brahman) 3 eyaculados por animal en la época seca y lluviosa, con un intervalo de 15 días entre colectas. Las muestras fueron obtenidas por el método de electro eyaculación, con equipo Electrojac IV en modo automático. El circuito produce una serie de 32 ciclos y cada ciclo brinda una intensidad ligeramente superior. Cada ciclo dura 2 segundos, con una pausa de 2 segundos. Posterior al análisis de calidad seminal, se obtuvo el plasma seminal, y el semen sobrante se dejó para criopreservación en pajillas de 0.54 ml.

V.4.2. Obtención de plasma seminal para identificación de proteínas

El plasma seminal se obtuvo por centrifugación de 2 ml de semen a 12.000 x g en micro centrífuga a 4°C por 5 minutos. El sobrenadante se centrifugó por segunda vez en idénticas condiciones y se pasó por filtro Millipore de 0.22 µm. Luego se identificó, almacenó en viales y se congeló a -80 ° C hasta su uso.

V.4.3. Obtención de ovarios

Los ovarios se obtuvieron en plantas de sacrificio de vacas comerciales con edades entre 4 y 6 años inmediatamente después del sacrificio. Para la selección se tuvo en cuenta que los ovarios no procedieran de tractos reproductivos con procesos patológicos. Los ovarios se transportaron en termos con solución salina al 0.9% con penicilina y estreptomicina, a 26°C de temperatura en un periodo máximo de 3 horas hasta el laboratorio (Figura 22).



Figura 22. Ovarios de vacas de matadero y recipiente con ovarios y medio de transporte de ovarios

V.4.4. Obtención de ovocitos inmaduros

Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron dos veces con solución salina al 0,9% con penicilina y estreptomicina, a 26°C de temperatura, con el fin de retirar material contaminante y sangre. Posteriormente se seleccionaron y aspiraron (con aguja G18 y jeringa de 20 ml) ovarios que no presentaran estructuras quísticas, que estuvieran en fase folicular (Orsi *et al.*, 2005), que no estuvieran atrésicos, con un diámetro de 2-6mm y se eliminaron los contenidos de folículos de tamaño mayor a 6 mm de diámetro.

Los ovocitos se obtuvieron por el método de corte o rallado (slicing) longitudinal y transversal sobre el ovario con bisturí, que permite obtener mayor número de ovocitos/ovario (Suss y Madison 1983, Hamano y Kuwayama 1993) (Figura 23).

Para su selección se evaluó la estructura del complejo *cumulus*-ovocitos (CCOs).

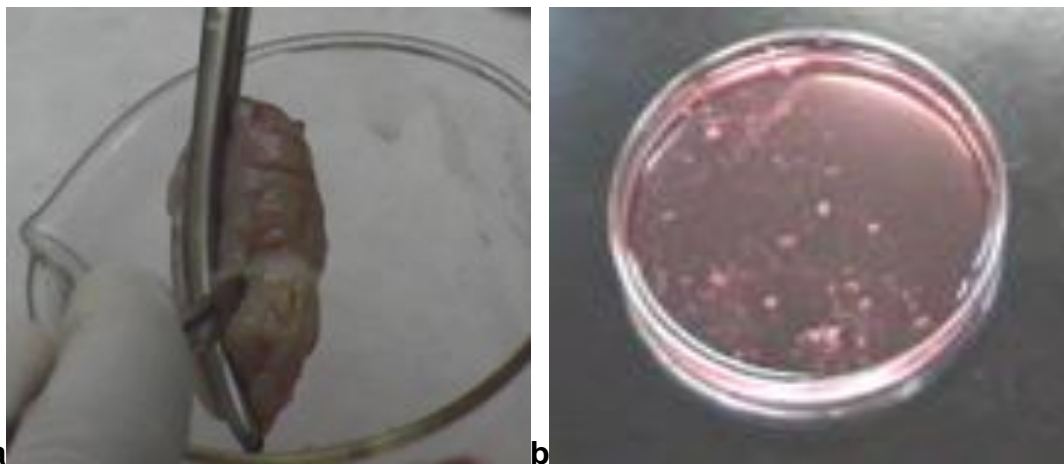


Figura 23. Obtención de ovocitos inmaduros de vaca. a. Rallado superficial del ovario para obtención de ovocitos, y b. ovocitos inmaduros colectados

V.4.4.1. Selección de complejos *cumulus*-ovocitos (CCOs)

Los complejos CCOs (Figura 24) fueron lavados dos veces en medio de colecta de ovocitos a base de TCM-199 con sales de Earle's y se seleccionaron bajo observación en el esteremicroscopio, en medio de colecta. Se determinó para su selección que presentaran más de 4 capas compactas de células del *cumulus oophorus* y el citoplasma del ovocito debería ser homogéneo y sin vacuolas. (Lonergan *et al.* 1994), con un diámetro mínimo de 110 μm , ya que un diámetro menor a este los hace incapaces de reanudar la meiosis y de madurar (Sato *et al.* 1990, Fair *et al.* 1995, Hyttel *et al.* 1986).

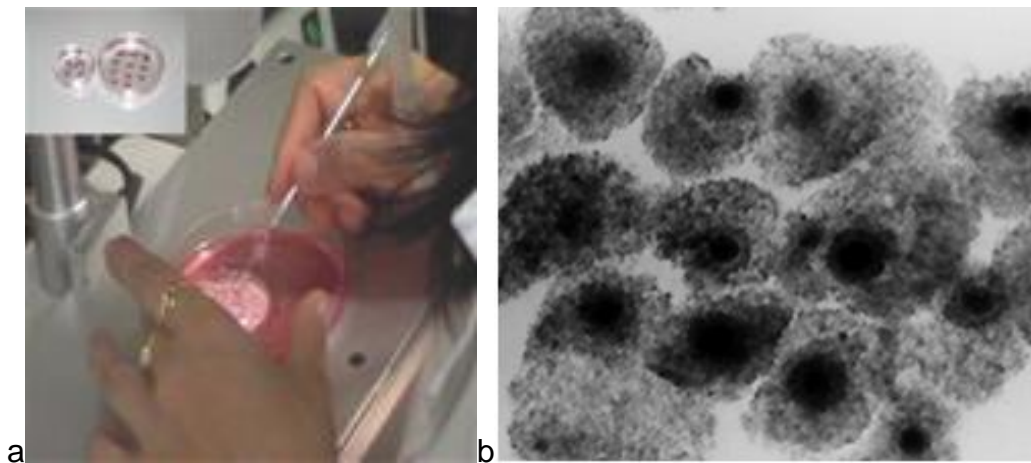


Figura 24. Selección del CCOs. a. Selección de CCOs y b. CCOs seleccionados

V.5. MÉTODO DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS SEMINALES

V.5.1. Evaluación Macroscópica

- Volumen del eyaculado: Para establecer el volumen del eyaculado, la muestra seminal fue recogida en tubos aforados que permitieron medir el volumen en mililitros (mL) (Figura 25).



- **Figura 25.** Evaluación macroscópica del semen de toro en un tubo cónico aforado y transparente que permite visualizar el volumen (9.5 ml), el color (blanco) y el aspecto (lechoso).

- Color: Normalmente suele ser de color blanco lechoso y de aspecto cremoso; un color amarillento debido a ciertos pigmentos no afecta la calidad del semen o la fertilidad del toro. (Figura 26).



Figura 26. Espectrofotómetro Minitube® para evaluación de concentración espermática en toros.

- Aspecto: Cremoso, Lechoso o acuoso relacionado con la concentración espermática.

V.5.2. Evaluación Microscópica:

V.5.2.1. Concentración espermática.

Se valoró por espectrofotometría, método indirecto que permite una determinación más exacta de la concentración, correlacionando inversamente el grado de dispersión de la luz con el número de espermatozoides en función de una curva preestablecida de calibración, empleando el Spermacue de Minitube®. El resultado se expresa como número de espermatozoides/mL (Figura 26).

V.5.2.2. Motilidad

La motilidad de las muestras se valoró mediante estimación visual al momento de la colecta, usándose como parámetro la motilidad individual progresiva, la cual es considerada como uno de los principales criterios en la determinación de la calidad espermática, ya que identifica la proporción de espermatozoides con movilidad progresiva, factor crítico en el proceso de fecundación (Malmgren, 1997).

Materiales y Métodos

Para la valoración de la motilidad individual se observan 2 campos de una gota de semen fresco (10 μ L) entre portaobjetos y cubreobjetos, a 200x y 400x sobre platina termostataada (37°C). Se consideraron los espermatozoides móviles teniendo en cuenta sólo aquellos que presentaron un movimiento progresivo y desechando aquellos con movimientos circulares o anómalos.

Para congelación del eyaculado fresco, se empleó sólo el semen que presentó como mínimo un 70% de motilidad individual. En los eyaculados con gran concentración, se diluyó el semen con citrato de sodio al 2,9%.

Las dosis de semen congelado se descongelaron a 37°C durante 1 minuto, y se tomaron de 10 a 12 μ L/pajuela, en un portaobjetos con cubre objetos. La observación se realizó a 100x y 400x. Los espermatozoides se evaluaron como porcentaje de espermatozoides móviles valorados en 3 campos.

V.5.2.3. Viabilidad espermática.

Para determinar la viabilidad espermática, únicamente se consideraron los porcentajes de espermatozoides vivos. Para ello se evaluó la integridad de la membrana espermática, mediante la tinción vital eosina-nigrosina: 5 % (p/v) de eosina amarilla, 10 % (p/v) de nigrosina hidrosoluble (Eliasson y Treichl, 1971; Bamba, 1988) en tampón de citrato sódico. Una gota de semen fresco se mezcló homogéneamente y con dicha mezcla y se observó en microscopio de campo claro (Bamba, 1988).

El principio de esta técnica se basa en la exclusión de la eosina por parte de los espermatozoides intactos, mientras que los muertos, con la membrana plasmática dañada absorben el color rojo del colorante (eosina). La nigrosina es empleada como coloración de contraste para facilitar su visualización. Los colorantes se mezclan en proporción 1:2 v/v y se adiciona una gota de cada uno, al semen extendido en un portaobjetos desengrasado y precalentado en placa termstotada a 37°C durante un minuto, para evitar falsos resultados por el shock térmico que podrían sufrir los espermatozoides.

Para la cuantificación, los resultados se valoran bajo microscopio en campo claro a 200X y 400X. Se evaluaron 200 espermatozoides por muestra, determinando como vivas las células sin colorear y como muertas las células que tiñen de rosa, porque captaron el colorante por daño en la membrana (figura 27.), y se expresan en porcentaje de células vivas y porcentaje de células muertas.



Figura 27. Espermatozoides coloreados con la tinción vital eosina nigrosina.

V.5.2.4. Morfología

Para este estudio se consideró únicamente el porcentaje de espermatozoides normales. El estudio de la morfología permite determinar el estatus fisiológico o patológico de la producción de espermatozoides (Saacke, 1983) suministrando información sobre el funcionamiento de los testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias. (Rodríguez-Martínez 2000).

Las muestras de semen se tiñeron en proporción 1:1 v/v, con la solución vital de eosina-nigrosina, como se ha indicado anteriormente y se evaluaron a 200 y 400x sobre una extensión de mezcla de espermatozoides y colorante en portaobjetos. Para su cuantificación se valoraron por dos veces 100 células espermáticas y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con aspecto normal (Figura 28).

Se considera que al menos el 70% de los espermatozoides evaluados deben ser normales

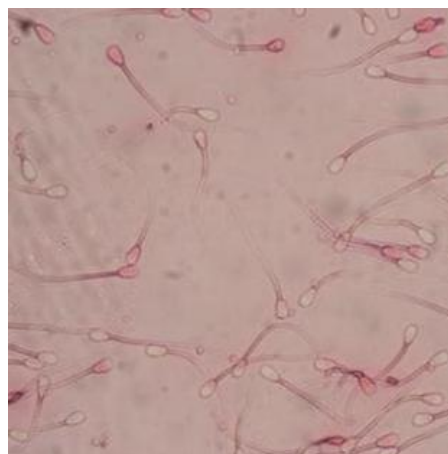


Figura 28. Espermatozoides teñidos con eosina nigrosina para visualización de anomalías

V.5.2.5. Índice de calidad espermática (ICE)

El índice de calidad espermática es una variable integradora que se obtiene para el caso de la evaluación el semen fresco de las variables de calidad, concentración, motilidad, morfología y viabilidad. Es un indicador que explica en forma integral la calidad seminal y se ha utilizado para comparar la mejor eficiencia entre época y entre raza de los toros estudiados y de igual forma para su selección.

Por otra parte, para efectos de comparación con el semen post-descongelado, se integraron únicamente en este llamado ICE a las variables motilidad, morfología y viabilidad.

V.6. PROTOCOLO DE CONGELACIÓN SEMINAL

Posterior a la valoración macroscópica y microscópica de la calidad del semen fresco, se calculó el número de dosis de 0.54 ml a congelar en cada eyaculado teniendo en cuenta que la concentración deseada para este estudio fue de 60×10^6 espermatozoides motiles /mL.

Primer paso

Determinación del volumen final: Para determinar el volumen final a la concentración espermática deseada del semen se realiza el siguiente cálculo con los resultados obtenidos en cada una de las variables evaluadas de calidad espermática.

$$\text{Vol Final} = \frac{\text{Vol eyaculado} \times \text{Concentración (N}^\circ \text{ esp}/10^6) \times \text{Motilidad (\%)} \times \text{Esp normales (\%)} \times \text{Viabilidad (\%)}}{60 \times 10^6}$$

Segundo Paso

Los diluyentes previamente preparados se utilizaron en igual cantidad para completar el volumen final y posterior equilibrio de la siguiente manera:

1. Diluyente A: Citrato fructosa 80% y yema de huevo 20%. El diluyente A y el eyaculado deben estar a la misma temperatura.

- Inicialmente, añadir diluyente A en cantidad equivalente al volumen de semen.
- Para completar el volumen de la fracción A se adiciona el resto del diluyente, a los 10-15 minutos siguientes.
- Homogenizar el semen ya diluido

2. Diluyente B (Glicerización): Diluyente A 86% y Glicerol 14%.

Materiales y Métodos

- Bajar la temperatura de la dilución del diluyente A y semen a 5°C en 2 horas.
- Añadir dilución B, esta fracción se divide en cuatro porciones que se van agregando cada 15 minutos.
- Conservación a 5°C

3. Equilibrio: Luego de finalizada la glicerización, se mantienen entre 4 a 5 °C en la cabina de refrigeración de 4 a 16 horas dependiendo del toro.

Tercer Paso

Marcaje de pajillas, llenado, sellado y congelación (Figura 29)

El marcaje y llenado de pajillas marca Minitube® se realizó con la máquina empacadora y selladora de pajillas dentro de un refrigerador que conserva la temperatura a 5°C. Posteriormente se colocan las pajillas en rampas metálicas, dentro de un termo u olla de congelación, a una altura de 5 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido. Las pajillas se mantienen en vapores de nitrógeno por 10 minutos y luego se sumergen directamente al nitrógeno líquido.



Figura 29. Marcaje, empackado y congelación. a. Máquina marcadora de pajillas. b. Máquina empacadora y selladora de pajillas. c. Semen congelado. d. Vista general del laboratorio de andrología del CRIA CI la Libertad de Corpoica.

Luego de sumergido en nitrógeno líquido se sacó una pajilla y se descongeló en baño de agua termostataado a 37°C. Para el caso del estudio se congeló toda la muestra.

Lo rutinario es la realización de una prueba de congelación y posteriormente determinar la motilidad, y si es superior al 40% se congela toda la muestra.

Procedimiento para evaluación de la viabilidad post-descongelación:

- Selección de 1 pajilla del lote congelado al azar.
- Descongelar la pajilla en baño de agua termostataado a 37°C.
- Para el estudio se determinó evaluar sólo a la hora 0 de descongelado las variables de motilidad progresiva, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática como se explicó en fresco.

V.7. PROTOCOLOS de ELECTROFORESIS

Los procesos de electroforesis unidimensional y bidimensional (Figura 30) se realizaron en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Bioindustria y Biotecnología (CBB) de CORPOICA, ubicado en CI Tibaitatá, en el municipio de Mosquera-Cundinamarca.

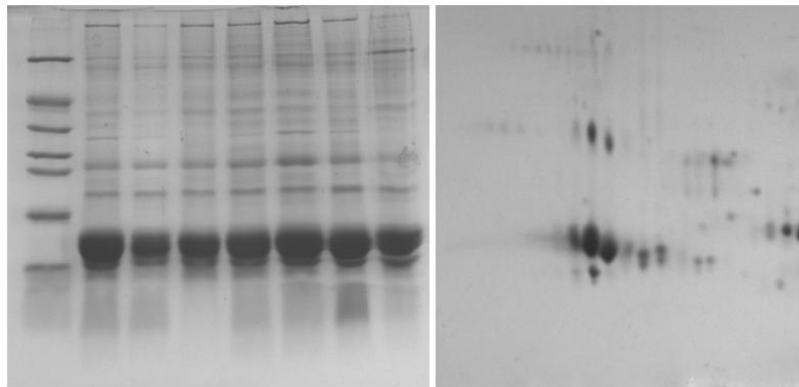


Figura 30. Mapas electroforéticos de bandas y puntos de proteína uni y bidimensional

V.7.1. PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL

La separación y cuantificación de las proteínas del plasma seminal en función de su peso molecular se realizó mediante electroforesis 1D SDS-PAGE de tipo desnaturizante y discontinuo, según protocolo de Laemmli (1970).

V.7.1.1. Determinación de la concentración de proteína de la muestra y cantidad de proteína a cargar.

La concentración de proteínas del plasma seminal se determinó mediante espectrofotometría, empleando el equipo Nano Drop, a una absorbancia de 280 nm.

La experimentación a nivel de laboratorio permitió determinar que 30 µg de proteína de plasma seminal era la cantidad más apropiada a cargar en los pocillos del gel que permitió obtener una mejor resolución de las bandas.

V.7.1.2. Elaboración de geles

Los geles se elaboraron en dimensiones de 7 x 8 cm, y de 1.0 mm de grosor. El gel separador estuvo constituido por acrilamida/bis-acrilamida y se realizó en gradiente de concentración lineal 10–20%. Las soluciones de poliacrilamida al 10% y 20% se prepararon a partir de una solución al 30% en un tampón constituido por Tris-Base 1.38 M, EDTA al 0.3% y SDS al 0.4% en agua, a pH 8.8. La polimerización se realizó con 0.8 µl /ml de TEMED y 17 µl /ml de per sulfato amónico (APS) al 10%. Al formar el gel se dejó el espacio que ocupará el gel compactador, el cual, se elaboró en gradiente lineal de 4%.

V.7.1.3. Procedimiento de Electroforesis Unidimensional.

La muestra de proteínas de plasma seminal a evaluar se diluyó en el tampón de corrida descrito anteriormente. La presencia de SDS en el tampón desnaturaliza y despliega las proteínas, cargándolas negativamente; el β mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro haciendo que la estructura cuaternaria de la proteína se pierda y que las unidades peptídicas se separen individualmente (Molloy, 2000); el TRIS actúa como regulador del pH; el EDTA actúa como quelante, y el glicerol aumenta la densidad de la muestra, para evitar que se pase de un pocillo a otro.

Para iniciar la corrida de la muestra, ésta se diluye en el tampón de corrida, se lleva a 100°C en baño de arena por 5 minutos y posteriormente se inicia la electroforesis en el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad), en tampón de cubetas. Durante el procedimiento se mantiene un voltaje de 85V, por aproximadamente 3 horas o hasta que el colorante llegue al final del gel. Simultáneamente con las muestras de plasma seminal, se corre el marcador de peso molecular (M 3913 Sigma ®, del rango de 6.500-66.000 Da), el cual se ubica en uno de los pocillos laterales del gel.

V.7.1.4. Tinción del gel captura y análisis de imágenes.

Para teñir el gel, se sumergió en un medio de tinción a base de azul de Coomassie al 0.025%, por 30 minutos y posteriormente se decoloró en solución de ácido acético al 10% y metanol al 30%.

Las imágenes se captaron en un documentador de imágenes Gel Doc 1000 (Bio-Rad) en formato TIFF, y se analizaron con el programa Quantity-One (Bio-Rad) que calculó los pesos moleculares de las diversas bandas proteicas con una curva de regresión lineal. El programa Quantity One elabora un esquema de las bandas y realiza un ajuste mediante el cual les asigna el mismo número a las que tienen pesos moleculares similares. Los resultados se expresan como densidad relativa. La densidad fue medida por triplicado y los resultados se expresan como densidad relativa promedio \pm S.E.M.

V.7.2. Protocolo de electroforesis bidimensional

El procedimiento de electroforesis en dos dimensiones se realizó de acuerdo con el método descrito por O'Farrell (1975). Este procedimiento permite separar las proteínas en una primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF) con base en su punto isoelectrónico, y en una segunda dimensión: electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de tipo desnaturizante, con base en su peso molecular.

Para el Isoelectroenfoque de las proteínas de plasma seminal se utilizaron tiras (IPGs) de poliacrilamida en gradiente de pH inmovilizado de 7 cm. de longitud (Bio-Rad). Con estas tiras se pueden enfocar proteínas ácidas y básicas en un solo gel (Bjellqvist *et al.* 1982). El gradiente de pH de las tiras utilizadas fue de 3-10.

V.7.2.1. Preparación de la muestra

La muestra de proteínas a analizar se diluyó en 125 μ l de un tampón de rehidratación, constituido por Urea 8M, la cual actúa como agente caotrópico, provocando la desnaturización de las proteínas por ruptura de los puentes de hidrógeno, y es agente quelante del cobre, por lo que protege de sus acciones oxidativas; Tributyl fosfina (TBP) 2mM como agente reductor que evita la unión de los enlaces disulfuro que forman artefactos durante la corrida, por lo que su adición mejora la resolución y reduce el rayado que distorsiona la imagen en el gel; CHAPS al 4% detergente que aumenta la solubilidad de las proteínas en su pI (Taylor *et al.* 2000); anfolitos al 0.2%, los cuales son compuestos anfóteros de bajo peso molecular con gran capacidad tampón cerca de su pI, y con una gran solubilidad y conductividad, y azul de bromofenol al 0.0002%, colorante con carga negativa y con una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos cuya función es la de ir por

delante de las proteínas para ir marcando el frente de corrida de la electroforesis y de esta manera poder parar el proceso antes de que se salgan las proteínas del gel. A este tampón de rehidratación se añadieron 5 µl de los marcadores 2D-PAGE (M 3411 Sigma®) con rango de peso molecular de 17.000-89.000 y rango de pI 7.6-3.8. Tanto los anfolitos como los marcadores 2D-PAGE y la TBP se añadieron al momento de adicionar la muestra de proteínas.

V.7.2.2. Determinación de la cantidad de muestra a cargar

Los resultados de diversos experimentos realizados en toros San Martinero y toros Cebú para hallar la cantidad óptima de proteína total que se debe añadir al tampón de rehidratación de las IPGs mostraron que 60 µg de proteína total del plasma seminal, por tira son suficientes para obtener una buena resolución de los puntos de proteína en la imagen de los geles analizados. Cantidades mayores de proteína por tira provocan la aparición de manchas en el recorrido de las proteínas más concentradas y el enmascaramiento de proteínas de poca concentración. Si por el contrario se reduce la cantidad de proteína, las proteínas de poca concentración no se pueden detectar sobre el gel.

V.7.2.3. Procedimiento electroforesis bidimensional

V.7.2.3.1. Rehidratación de tiras (IPGs)

Los 60 µg de proteínas de plasma seminal se adicionaron a 125 µl del tampón de rehidratación ya mencionado. Igualmente en este momento se adicionaron 2 µl de TBP y 0.75 µl de anfolitos y la cantidad de marcadores 2D-PAGE. La mezcla se extendió sobre uno de los canales de la bandeja de hidratación y sobre ella se depositó la tira (IPG) de manera que el gel quedara en contacto con la dilución. Finalmente, la tira se recubrió con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra. La rehidratación de las tiras se realizó de forma pasiva, para lo cual se dejaron a temperatura ambiente por un tiempo mínimo 11 horas, según protocolo de Bio-Rad.

V.7.2.3.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Una vez concluida la hidratación pasiva de la tira, se procedió a realizar el Isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas, en el equipo PROTEAM-IEF cell (Bio-Rad), según protocolo de la misma casa, para lo cual se colocan las tiras verticalmente sobre papel secante, con el fin de eliminar el aceite mineral, que puede interferir con el proceso de Isoelectroenfoque.

Materiales y Métodos

Previamente se colocaron sobre los electrodos de la bandeja de isoelectroenfoco porciones de papel secante embebidos con 8µl de agua desionizada, con el fin de retirar sales y contaminantes que pueden alterar el proceso.

Posteriormente se colocaron las tiras en las bandejas de IEF y se cubrieron con aceite mineral para prevenir la evaporación y absorción de dióxido de carbono en el proceso, y se inició el proceso de corrida, con un máximo de corriente de 50 µA/tira, y un voltaje total de 8.250 voltios a 20 °C, durante 180 minutos.

V.7.2.3.3. Equilibrio de las tiras (IPGs)

Una vez terminado el proceso de IEF y antes de realizar la segunda dimensión, se procedió a realizar el proceso de equilibrado de las tiras en tampones que tienen como base el SDS. El procedimiento se realizó en dos pasos previo al drenaje del aceite de las tiras. En el primer paso, las tiras se colocaron en el fondo de los canales de la bandeja de rehidratación con el gel mirando hacia arriba y se cubrieron con 2.5 ml de un tampón de equilibrio compuesto por urea 6 M, Tris 0.375 M, pH 8.8, SDS 2%, 20% de glicerol, DTT 2% (w/v); la bandeja se mantuvo en agitación suave durante 15 minutos. En el segundo paso se desechó el primer tampón y se adicionó sobre las tiras 2.5 ml de un segundo tampón, compuesto por urea 6 M, Tris 0.375 M, pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20% y Iodoacetamida 2.5% (w/v); en este segundo paso se mantuvo la bandeja en agitación suave por 15 minutos. Con el equilibrio de las IPGs se logra la reducción y alquilación de las cisteínas (el DTT reduce los grupos sulfhidrilo y la Iodoacetamida alquila los grupos reducidos). Esto reduce considerablemente el rayado vertical que suele aparecer en los geles de la segunda dimensión.

V.7.2.3.4. Segunda dimensión: Electroforesis en SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La segunda dimensión se corrió según protocolo de Laemmli (1970) en equipo Mini Protean II (Bio-Rad)

V.7.2.3.5. Elaboración de geles de poliacrilamida

En la segunda dimensión o SDS-PAGE, se utilizaron geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor x 7 cm de ancho y 8 cm de alto. El gel se formó en gradiente de concentración lineal 10%-20% de poliacrilamida. Las soluciones de poliacrilamida al 10% y 20% se prepararon a partir de una solución al 30% en un tampón constituido por Tris-Base 1.38 M, EDTA al 0,3% y SDS al 0.4% en agua, a pH 8.8. La polimerización se realizó con 0.8 µl /ml de TEMED y 17 µl /ml de persulfato amónico (APS) al 10%. Al formar el gel se dejó un espacio de 0.5 cm para colocar la tira procedente de la primera dimensión ya equilibrada

V.7.2.3.6. Procedimiento Segunda dimensión: SDS-PAGE

Después de equilibrada la tira de la 1ª dimensión, ésta se colocó en el espacio que se dejó al formar el gel, para lo cual se rellenó el espacio con una solución líquida de agarosa al 2% y 0.0002% de azul de bromofenol, la cual se calentó 10 minutos antes. Este procedimiento permite asegurar que la tira quede en contacto directo con el gel de poliacrilamida. Se debe evitar la formación de burbujas entre la tira y el gel. La electroforesis se corrió en tampón de cubetas a 85 Voltios durante 180 minutos o hasta que el colorante saliera al final del gel.

V.7.2.3.7. Tinción del gel, captura y análisis de imágenes

El gel se sumergió en un medio de tinción a base de azul de Coomasie al 0.025%, por 30 minutos y posteriormente se realizó su desteñido con una solución de ácido acético al 10% y metanol al 30%, por 30 minutos, en agitación suave.

Las imágenes se captaron en un documentador de imágenes Gel Doc 1000 (Bio-Rad), en formato TIFF. El análisis de la imagen de los geles de 2D se realizó con el programa PD Quest de Bio-Rad. El programa permite detectar, cuantificar y comparar los diversos puntos de proteína encontrados en la imagen de un gel y de geles entre sí. El programa modela matemáticamente los puntos de proteína como distribuciones gaussianas en tres dimensiones y usa los modelos para determinar la máxima absorción.

Cuando se comparan geles entre sí, como en este caso, el programa selecciona la imagen del gel de mayor nitidez y con mayor cantidad de puntos (Máster), y compara los demás geles teniendo como referencia el gel seleccionado. El punto de proteína detectado se mide en unidades de densidad óptica y tiene en cuenta el número de píxeles que conforman el punto en las tres dimensiones. El resultado se puede expresar en partes por millón o en porcentaje, a criterio del investigador. El programa asigna automáticamente un número a cada punto de proteína detectado.

V.8. PROTOCOLO DE PRODUCCIÓN *in vitro* DE EMBRIONES

V.8.1. Maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos

El medio de maduración fue previamente equilibrado por 6 horas a 38.5°C y 5 % CO₂.

Materiales y Métodos

Los CCOs seleccionados en medio de colectase lavaron tres veces en gotas de 50 μ l de medio de maduración TCM-199 NaHCO_3 suplementado, y se cultivaron en placas Nunc® de 4 pocillos, dejando 50 ovocitos/500 μ l del mismo medio/pocillo, y fueron llevados al incubador en condiciones atmosféricas de 38.5-39 °C, 5% de CO_2 y 90% de humedad relativa, por un periodo de 24 horas.

V.8.2. Fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos

Los medios de fecundación (FIV-TALP suplementado) y de capacitación (SPERM-TALP suplementado) se equilibraron en estufa a 38.5°C, con atmósfera saturada de humedad y 5 % CO_2 en aire, 6-8 horas antes de iniciar el proceso. El gradiente de Percoll, se atemperó a 28-30 °C.

V.8.2.1. Preparación de los espermatozoides: Capacitación espermática

La pajilla de semen se descongeló por inmersión en agua a 37°C durante 1 minuto. Posteriormente, el semen de la pajilla se transfirió suavemente por las paredes al tubo que contenía el gradiente de Percoll 45/90% en Sperm-Talp, dejando una gota de semen en la pajilla, para realizar el análisis de calidad seminal bajo observación en microscopio.

El gradiente de Percoll, con el semen en la superficie, se centrifugó a 700 gravedades por 30 minutos, en centrifuga refrigerada. Posteriormente se retiró el sobrenadante, dejando el pellet que contenía los espermatozoides móviles. Al pellet se le adicionaron 4 mL del medio Sperm-Talp, y esta dilución se centrifugó a 200 gravedades por 10 minutos. Concluida la segunda centrifugación, se eliminó el sobrenadante, y sobre el pellet se adicionaron 500 μ L de medio FIV. De esta dilución se efectuó el cálculo de concentración espermática y el volumen necesario para la FIV, con 1.000.000 de espermatozoides/ ml.

V.8.2.2. Preparación y fecundación de ovocitos

Durante el tiempo de la capacitación espermática, se cambió el medio de maduración en el que estaban los ovocitos por medio de fecundación, lavándolos dos veces en este medio, dejando 50 ovocitos por pocillo de 500 μ L en el incubador.

El cocultivo de ovocitos y espermatozoides permaneció durante 18 horas en el incubador a 39°C, 5% de CO_2 en aire y saturado de humedad, que es el tiempo determinado para la FIV bovina.

V.8.2.3. Cultivo embrionario

A las 18 horas post-fecundación, se procedió a retirar las células del *cumulus* o denudar los ovocitos llevándolos en 500 μ l de medio Hepes-Talp al vórtex por 3 minutos, levantándolos cada 30 segundos. Luego se recuperaron todos los posibles cigotos, se lavaron varias veces en medio SOF suplementado de cultivo embrionario (previamente equilibrado por un mínimo de 8 horas a 38.5 °C) y finalmente se transfirieron al medio SOF, y se incubaron a 38.5°C y 5% CO₂ en aire saturado de humedad, en una cámara modular para obtener un microambiente controlado con la siguiente mezcla de gases: 7% de O₂, 5% de CO₂, y 87.5% de nitrógeno, necesarios para el desarrollo embrionario bovino. Allí permanecieron durante 7-8 días hasta llegar al estado de blastocisto (Figura 31).

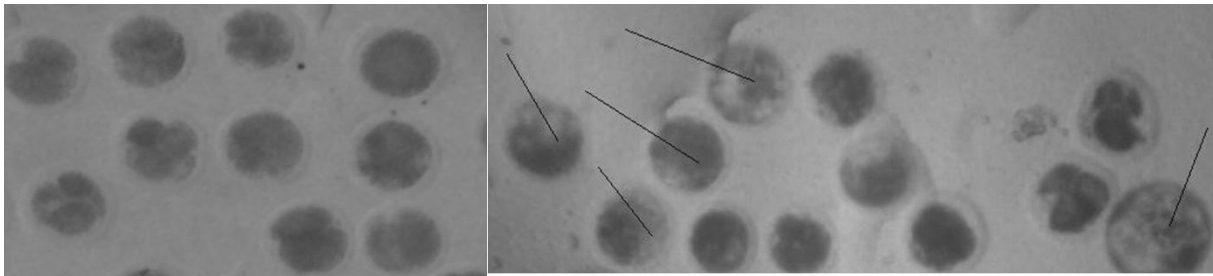


Figura 31. Imágenes de blastocistos observadas en fresco al séptimo día de cultivo.

V.8.2.4. Valoración microscópica de resultados

Para denudar los posibles cigotos y ser evaluados, se transfirieron de medio FIV a una placa de pocillos con 350 mL de DPBS y 150 mL de hialuronidasa durante un minuto y se pipetearon hasta observar totalmente desprendidas las células del *cumulus* y observar claramente la zona pelúcida. Posteriormente, se fijaron por 30 minutos a temperatura ambiente en medio de fijación a base de glutaraldehído al 0,5%, se lavaron en DPBS que contenía 1 mg/mL de polivinilpirrolidona (PVP) y se pasaron por 30 minutos a 500 μ L del medio de tinción.

Posteriormente, se lavaron en DPBS con PVA y se les añadió de nuevo colorante bisbenzimidazoles en glicerol, con PBS y PVA. Cubriendo los ovocitos y con unos 15 μ L en la pipeta, se recogieron y se agruparon sobre una lámina portaobjetos, la cual se cubrió con un cubreobjetos (15 x 15mm) y se selló para que conservaran la fluorescencia.

Se observaron a 200x y 400x en microscopio (Leica modelo DM2000) y filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta.

Para el estudio de los ovocitos de los diferentes estadios nucleares se consideró el porcentaje de ovocitos fecundados (ovocitos con 2 pronúcleos, Figura 32).

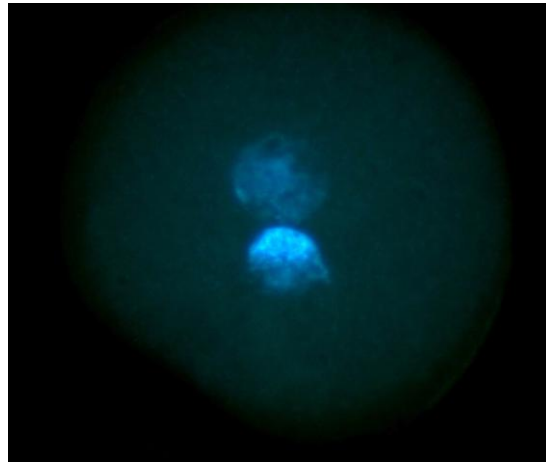


Figura 32. Ovocito de vaca teñido con Hoechst. Ovocito fecundado: la imagen muestra un ovocito penetrado (monospermico), con sus dos pronúcleos masculino (*m*) y femenino (*f*).

V.9. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el propósito de probar la hipótesis planteada para esta investigación “ Las proteínas plasma seminal del toro Sanmartinero explican los cambios sobre los indicadores de calidad espermática, fertilidad y producción de blastocistos por efecto de la época (Lluviosa y Seca) y por efecto de la raza (SM y Cebú) , 7 toros reproductores puros de la raza San Martinero y Cebú Brahman se seleccionaron al azar del banco de Germoplasma de CORPOICA y de un Criadero reconocido de Ganado Cebú puro. Los ejemplares fueron puestos en situaciones similares bajo pastoreo en *Brachiaria decumbens* en los campos experimentales del Centro de Investigaciones la libertad de CORPOICA. El tiempo de evaluación por época se realizo en el ganado Sanmartinero tanto en lluviosa como la época seca y el tiempo de evaluación entre razas (SM y Cebú) y únicamente se realizo en la época lluviosa. Para cada toro los muestreos seminales y análisis en fresco se realizaron por tres veces y del semen congelado de cada toro en cada muestreo se seleccionaron 5 pajillas al azar para su respectiva evaluación de calidad espermática, fecundación in vitro y producción de blastocistos.

El análisis de la información se basó en Modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo. Para evaluar el efecto de la época (Lluvia y Seca) y la raza (SM y Cebú) sobre las variables de calidad espermática se utilizó el procedimiento MIXED (Modelo mixto) con medidas

Materiales y Métodos

repetidas en el tiempo modelando la mejor estructura de covarianzas a partir de tres modelos (CS–Compound Symmetry; U–Unstructured; A –Autoregressive) con el paquete estadístico SAS® (versión 9.0), utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X3 para calidad del semen en fresco y 2x5 para calidad del semen posdescongelado, bajo el siguiente modelo (Montgomery, 1991).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_i + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} Variables de calidad espermática del k-ésimo individuo en la i-ésima época o raza y en el j-ésima repetición
- μ es el promedio poblacional de la variable respuesta (variables de calidad espermática)
- α_j es el efecto de la época o raza “i”, con i = 1 y 2 (1 = Lluvia, 2 = Seca ó 1 = SM, 2 = Cebú)
- β_i es el efecto de la repetición “j”, con j = 1, 2, 3 semen fresco y 1,2,3,4 y 5 para semen posdescongelado
- $(\alpha\beta)_{ij}$ es la interacción de los efectos principales
- ε_i es el error asociado con el k-ésimo individuo en la i-ésima época o raza en la j-ésima repetición.

Se comprobaron los supuestos del modelo: i) material experimental homogéneo, ii) el error experimental es una VAI $\sim N(0; \sigma^2)$ (Levene, 1960; Shapiro y Wilk, 1965).

Para la caracterización y determinación del efecto que tienen las proteínas sobre la calidad espermática, en un primer momento del análisis se considera a nivel general la información obtenida de los geles unidimensionales (bandas de proteína) y bidimensional (puntos de proteína), para la generación de mapas electroforéticos de plasma seminal de cada una de las razas y para ser evaluados mediante un análisis de varianza y pruebas de correlación simple.

Seguidamente con el total de las proteínas se considera un análisis de frecuencias que permite la selección de las que más se repetían entre muestreos y entre toros.

Para el análisis de las proteínas seleccionadas sobre los cambios de las variables de calidad espermática se diseñaron ecuaciones mediante el paquete estadístico SAS (versión 9.0) con el cual fueron incluidas las proteínas en estudio para cada época y raza mediante el procedimiento REG.

Materiales y Métodos

Posteriormente fueron seleccionadas las proteínas significativas mediante el procedimiento PRINCOMP con el que fueron descartadas, una a una, aquellas variables con valores de $Pr > |t|$ altos. El modelo lineal ajustado fue el siguiente:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{i1} + \beta_2 X_{i2} + \beta_3 X_{i3} + \dots + \varepsilon_i$$

Donde:

- Y_i variable dependiente (variables de calidad espermática)
- β_0 intercepto—valor de Y cuando X vale 0
- β_i coeficiente de regresión—valor en el cual se modifica Y cuando X_i varía en una unidad con i variando de 1 hasta n
- X_i variables independientes (proteínas espermáticas)
- ε_i error de estimación

Además se comprobaron los supuestos del modelo:

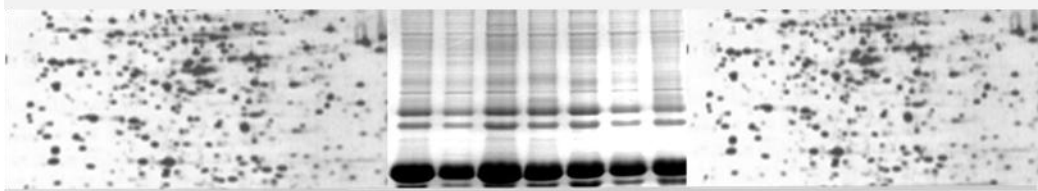
- a. material experimental homogéneo,
- b. la independencia de los errores por medio del cálculo del coeficiente de correlación de los errores mediante la prueba de Durbin-Watson D.
- c. el error experimental es una $VAI \sim N(0)$ utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y el método de los mínimos cuadrados (Graybill, 1961; Shapiro y Wilk, 1965).

Estadística multivariada: Dada la posibilidad de no poder desarrollar modelos de predicción fueron seleccionadas aquellas proteínas que se deberían incluir en cada uno de los modelos a través del análisis de componentes principales, la cual es una técnica multidimensional que no supone ninguna estructura sobre las observaciones (variables de calidad espermática) que permite determinar la correlación existente entre los descriptores (proteínas).

Modelos de predicción: A partir de las proteínas seleccionadas se diseñaron nuevas ecuaciones de predicción con el paquete estadístico SAS (versión 9.0) mediante el procedimiento REG. Posteriormente fueron seleccionadas las proteínas significativas mediante el procedimiento PRINCOMP con el que fueron descartadas, una a una, aquellas variables con valores de $Pr > |t|$ altos.

Coefficientes de correlación parciales: Por último, se utilizó el procedimiento REG con todas las proteínas y cada una de las variables respuesta (variables de calidad espermática) para determinar si existe una regresión lineal.

VI. RESULTADOS



VI. RESULTADOS

VI.1. VARIABLES DE CONTROL

Los animales experimentales utilizados para la comparación de época y raza fueron monitoreados continuamente con algunos indicadores de control como el hematocrito como indicador de salud y estado hídrico y el fibrinógeno como marcador de inflamación (Coppola 2006), el cuál es una proteína plasmática de fase aguda producida y liberada al torrente sanguíneo por el hígado en respuesta a un proceso inflamatorio (Gabay y Kushner 1999).

Ambos parámetros se usaron para determinar algún efecto o respuesta que alterara los resultados por las continuas confrontaciones de los toros. Además se evaluó condición corporal como indicador de su estatus nutricional (Figura 12).

Tabla 12. Evaluación de indicadores de salud y condición corporal de toros bovinos criollos San Martinero en la época lluviosa y seca durante el desarrollo del estudio.

Variables Hematoquímicas	Muestras (n)	San Martinero época lluviosa	Muestras (n)	San Martinero época seca
Hematocrito (%)	41	33.18 ± 3.92 ^a	39	32.19 ± 2.42 ^a
Fibrinógeno g/dl.	40	0.65±0.16 ^a	39	0.46±0.22 ^a
Condición Corporal* 1 – 5	39	3.9±0.4 ^a	38	3.5±0.2 ^b

Promedios ± SEM (error estándar de la media). -Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa (*) o altamente significativa (**) a un α del 5%.

Cuando se comparó la raza San Martinero en las dos épocas, lluviosa y seca (Tabla 12), se observó que el hematocrito y el fibrinógeno no indicaron cambios que señalen alteraciones en la salud. En cuanto a la variable condición corporal, se observan cambios significativos ($p < 0.05$) con diferencias entre medias de 3.9 ± 0.4 a 3.5 ± 0.2 a favor de la época lluviosa. A pesar de estas diferencias estadísticas, los estados corporales encontrados en la época seca no significan situaciones que alteren en forma drástica su condición fisiológica.

En la Tabla 13 se pueden observar los resultados obtenidos al comparar la raza San Martinero con la raza Cebú, con respecto a las variables hematocrito, fibrinógeno y condición corporal, las cuales no señalan cambios que indiquen valores que puedan afectar la salud. En este sentido podemos definir que los animales se mantuvieron en buenas condiciones durante el desarrollo del proyecto.

Tabla 13. Evaluación de indicadores de salud y condición corporal de toros bovinos criollos San Martinero y Cebú durante el desarrollo del estudio.

Variabes Hematoquímicas	Muestras (n)	San Martinero	Muestras (n)	Cebú
Hematocrito (%)	41	33.18 ± 3.92 ^a	42	35.17 ± 4 ^a
Fibrinogeno g/dl	40	0.65±0.16 ^a	42	0.72±0.3 ^a
Condición Corporal 1 – 5	39	3.9±0.4 ^a	37	4.0±0.6 ^a

Promedios ± SEM (error estándar de la media). Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa (*) o altamente significativa (**) a un α del 5%.

VI.2. CARACTERIZACIÓN DE PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO CRIOLLO SAN MARTINERO Y CEBÚ EN EDAD REPRODUCTIVA BAJO CONDICIONES DEL TRÓPICO BAJO COLOMBIANO

En este apartado se presentan los resultados de las proteínas encontradas en el plasma seminal del ganado criollo San martinero en época lluviosa comparada con la época seca y con las proteínas del plasma seminal del Cebú Brahman.





VI.2.1. Estudios unidimensionales (SDS-PAGE)

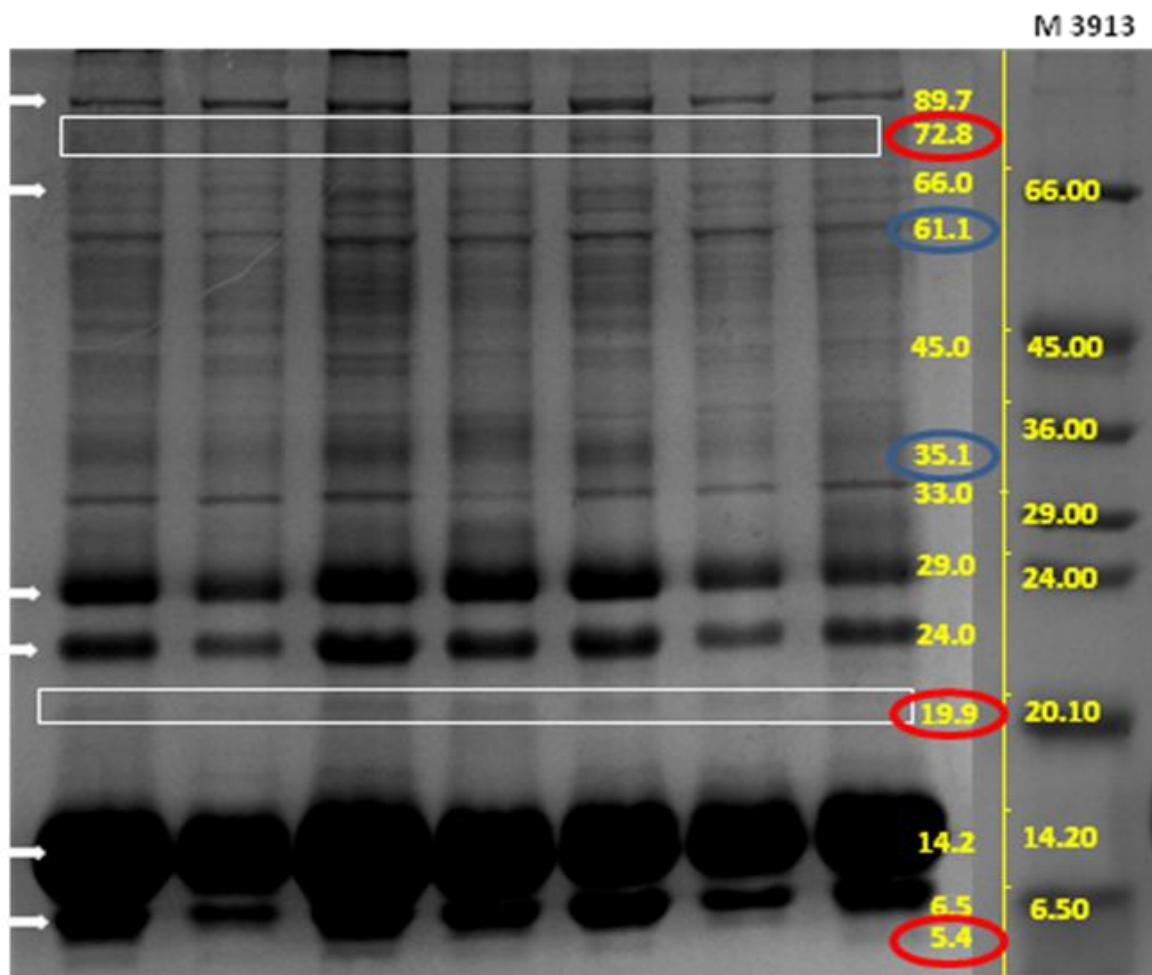
VI.2.1.1. Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero

En la figura 33 y Tabla 14, se observan las bandas de proteínas detectadas por electroforesis en una dimensión (1D) del plasma seminal de toros San Martinero, en peso molecular, concentración promedio y frecuencia presentada. Los valores encontrados de pesos moleculares de las diferentes proteínas del plasma seminal permiten establecer tres grupos para la discusión. En un primer grupo se incluyeron las bandas de proteínas que alcanzaron pesos moleculares superiores a 60 kDa (las bandas de 89.7, 72.8, 66.0 y 61.1 kDa. En un segundo grupo, las bandas de proteínas de peso molecular entre 30 y 60 kDa en donde pudimos apreciar bandas con pesos de 45.0, 35.1, 33.3. Finalmente, en el tercer grupo se

Resultados

incluyeron las bandas de proteínas de pesos moleculares menores a 30 kDa, en donde se registraron proteínas de 29.0 kDa, 24 kDa, 19.9 kDa, 1.2 kDa, 6.5 kDa y 5.4 kDa.

Figura 33. Mapa electroforético 1D de bandas de proteína del plasma seminal en 7 toros San Martinero en la época de lluvias, estratificado por peso molecular. Bandas de proteínas que siempre se presentaron , Bandas de proteínas de mayor frecuencia , Bandas de proteínas de menor frecuencia  y bandas propias en este estudio para la raza 



Cuando tomamos cada grupo de proteínas clasificadas para la discusión de este estudio, observamos que su concentración es inversa al peso molecular y que difiere en forma significativa ($p < 0.05$), siendo mayor la concentración en las clasificadas como pesos moleculares menores de 30 kDa (Tabla 14). Este grupo es el que identifica más a las proteínas del plasma seminal del toro reportadas (Moura 2005, Moura *et al.*, 2007), y representa el 70.1% de las concentraciones de proteínas del plasma seminal detectadas,

Resultados

seguida de las concentraciones de proteínas de peso molecular entre 30 y 60 kDa que comprenden un 15.4% y de las de peso molecular mayor a 60 kDa, con un 14,8%. Al hacer comparación de medias entre estas concentraciones se observan cambios de forma significativa ($p < 0.05$)

Tabla 14. Pesos moleculares, concentración y frecuencias de las bandas de proteína detectadas en una dimensión en el plasma seminal de la Raza San Martinero, época lluviosa.

GRUPO DE PROTEÍNAS DE	PESO MOLECULAR (kDa)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO POR GRUPO* (%)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO POR BANDA (%)	FRECUENCIA
Pesos moleculares mayores a 60 kDa	89.7	2,695 ^c ± 0.856	1.86±0.71	21
	72.,8		3.19±0.74	4
	66.0		2.82±0.61	21
	61.1		2.89±0.79	20
Pesos moleculares entre 30 y 60 kDa	45.0	3,811 ^b ± 1,65	4.12±1.50	14
	35.1		4.28±2.17	20
	33.3		3.02±2.17	16
Pesos moleculares menores a 30 kDa	29.0	10,616 ^a ± 6.98	8.52±2.39	21
	24.0		8.21±1.23	21
	19.9		2.30±0.54	5
	14.2		20.74±8.09	21
	6.5		8.92±2.24	21
	5.4		3.34±0.30	4

Promedios ± SEM (error estándar de la media). Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5%.

Por otra parte, en la figura se puede apreciar que las proteínas que siempre se presentaron fueron las proteínas de peso molecular 89.7, 66.0, 29.0, 24.0, 14.2 y 6.50 kDa. Las proteínas de mayor frecuencia (más de 15 veces) fueron las proteínas de 61.1 y 35.1 kDa y las de menor frecuencia (igual o menos de 7 veces) fueron las proteínas de 72.8, 19.9 y 5.4 kDa.

VI.2.1.2. Proteínas del plasma seminal del ganado Cebú

En la Figura 34 y Tabla 15, al igual que en el ganado San Martinero, se pueden observar las proteínas clasificadas en los tres grupos para este estudio, en donde el comportamiento de las concentraciones proteicas en las diferentes bandas es inverso al peso molecular. Las mayores concentraciones de proteína, que corresponden al 70.2% del total de las proteínas del plasma seminal, se localizaron en las de peso molecular menor a 30 kDa y señalaron promedios con diferencia significativa ($p < 0.05$), seguida del grupo de proteínas ubicadas en el rango de peso moleculares entre 30 y 60 kDa (15.8%) y las de peso molecular mayor de 60 kDa (14.1%).

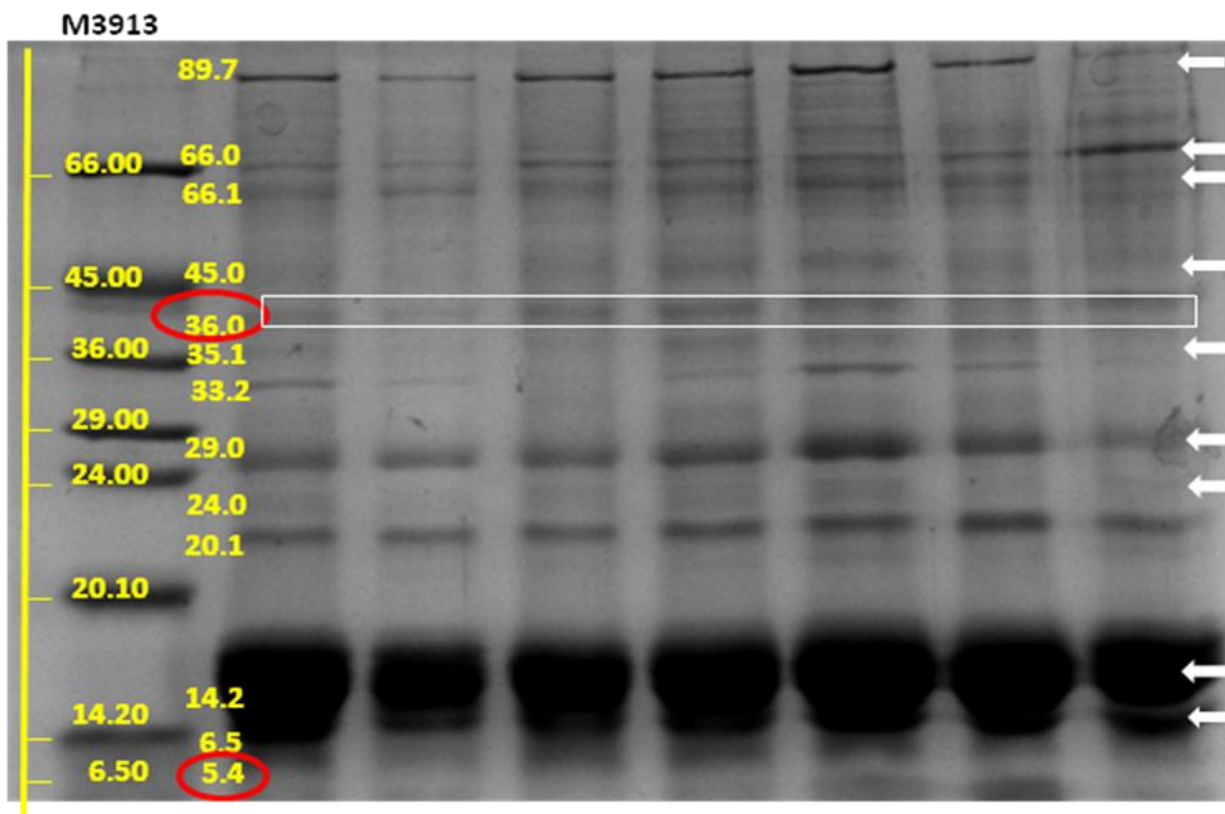


Figura 34. Mapa electroforético 1D de bandas de proteína del plasma seminal en 7 toros Cebú en la época de lluvias, estratificado por peso molecular. Bandas de proteínas que siempre se presentaron \Rightarrow , Bandas de proteínas de mayor frecuencia \circ , Bandas de proteínas de menor frecuencia \ominus bandas propias en este estudio para la raza $\boxed{}$.

Por otra parte, las proteínas que siempre se presentaron fueron las proteínas de peso molecular 89.7, 66.0, 61.15, 45.0, 35.1, 29.0, 24.0, 14.2, y 6.5 kDa. Las de menor frecuencia (igual o menor de 7 veces) fueron las proteínas de 36 y 5.4 kDa

Tabla 15. Pesos moleculares, concentración y frecuencia de presentación de proteínas del plasma seminal de toros Cebú en la época lluviosa.

GRUPO DE PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (kDa)	CONCENTRACIÓN PROMEDIA POR GRUPO* (%)	CONCENTRACIÓN PROMEDIA POR BANDA (%)	FRECUENCIA
Pesos moleculares mayores a 60 kDa	89.7	3.64 ^b ±0.50	2.49±0.51	21
	66.0		3.38±0.94	21
	61.15		4.93±1,90	21
Pesos moleculares entre 30 y 60 kDa	45.0	3.03 ^b ±1.56	3.31±1.40	21
	36.0		2.20±0.28	3
	35.1		3.42±1.14	21
	33.2		3.18±1.82	15
Pesos moleculares menores a 30 kDa	29.0	10.79 ^a ±11.62	7.37±1.58	21
	24.0		9.03±6.71	21
	14.2		22.48±7.61	21
	6.5		9.63±4.16	21
	5.42		5.43±1.07	7

Promedios ± SEM (error estándar de la media). Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5%.

VI.2.1.3. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática entre los ganados San Martinero y Cebú.

La información obtenida al comparar la raza criolla San Martinero con ganados de la raza Cebú, de mayor influencia en el trópico Colombiano (Fedegan, 2010), permite evidenciar a nivel general la presencia de un total de 14 bandas de proteína (Tabla 16), con pesos moleculares entre 5.4 kDa y 89.7 kDa, en las cuales el ganado San Martinero se ve representado en 13 bandas y el ganado Cebú Brahman en 12 bandas con concentraciones de proteína de 74.20 ± 5.17 % y 76.84 ± 5.69 % respectivamente que no difieren significativamente ($p > 0.05$). Las bandas de mayor concentración para ambas razas San Martinero y Cebú se denotan en las proteínas de peso molecular de 14.2 kDa (20.74 ± 8.09 % y 22.48 ± 7.61 %) y representan el 28 y 29% de todas las bandas de proteínas registradas en el estudio. En un segundo lugar de mayor concentración de proteínas encontramos las de peso molecular 6.5, 24 y 29 kDa (8.91 ± 2.24 %, 8.20 ± 1.23 %, 8.51 ± 2.39 % para San Martinero y 9.6 ± 4.16 %, 9.0 ± 6.71 %, 7.37 ± 1.58 % para Cebú) que constituyen el 25.64% y 26.03% de las proteínas del plasma para cada raza. Al asociar las proteínas con los indicadores de calidad espermática se advierten correlaciones directas entre concentración de espermatozoides y las bandas de 29

kDa ($p < 0.05$, $r = 0.48$), de 36 kDa ($p < 0.001$, $r = 0.74$) y de 33.2 kDa ($p < 0.05$, $r = 0.68$). De igual manera esta última banda se asocia en forma inversa con la motilidad espermática ($p < 0.05$, $r = -0.60$) y viabilidad espermática ($p < 0.05$, $r = -0.58$). Este resultado inverso sugiere una doble función de esta banda de proteína, por un lado puede actuar como un factor antimotilidad, que explicaría en parte los menores porcentajes de motilidad de los espermatozoides de los toros de esta raza en relación con los toros San Martinero, y por otro lado, actuar como un factor de capacitación del espermatozoide, que explicaría los menores valores en el porcentaje de espermatozoides viables de la raza Cebú, en relación con los toros criollos Colombianos.

En la Tabla 16, en el análisis de la electroforesis se distinguen 2 bandas de proteínas, 72.8 kDa con una concentración de 3.18 ± 0.74 % y de 19.9 kDa con una concentración de 2.30 ± 0.54 % en el ganado criollo San Martinero, que no están en el Cebú. De igual forma en el Cebú se visualiza una proteína de 36 kDa, con una concentración proteica de 2.20 ± 0.28 %, que no está presente en el San Martinero. Esta respuesta puede ser debida a la especificidad de cada raza que y a sus características propias. Finalmente, el análisis de varianza reveló que los toros Cebú presentan mayores valores de concentración que los San Martineros ($p < 0.001$) en las tres bandas de proteína de 5.4 kDa (5.43 ± 1.07 y 3.34 ± 0.30 %), 61.1 kDa (4.93 ± 1.93 y 2.89 ± 0.79 %), y 66.0 kDa (3.38 ± 0.94 y 2.80 ± 0.61 %).

VI.2.1.4. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática en ganado San Martinero en la época seca y lluviosa

Los resultados observados al evaluar la raza criolla San Martinero en las dos épocas bien definidas que se presentan en el trópico Colombiano, lluviosa y seca, señalan en términos generales la presencia de 16 bandas de proteína con pesos moleculares entre 5.4 y 89.7 kDa (Tablas 17). De estas bandas de proteínas se resaltan la banda de proteína de peso molecular 14.2 kDa que presenta concentraciones de 20.74 ± 8.09 % en la época lluviosa. Esta concentración desciende sin ser significativa $p > 0.05$ en la época seca a 17.34 ± 5.14 %. Las concentraciones representan 27.96% y 20.78%, respectivamente, de la concentración total de proteína del plasma seminal registradas en este estudio bajo las dos condiciones de la época (Tabla 17). Por otra parte, se observa que las cuatro proteínas de mayor concentración y diferenciales de las demás proteínas dentro de la misma época encontradas ($p < 0.05$), son las proteínas de peso molecular 6.5, 14.2, 24 y 29 kDa y comprenden el 62.5% del total de la proteína presente en el plasma seminal. Al evaluar las concentraciones del total de las bandas de proteína entre las dos épocas se observa que no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$). Sin embargo, las bandas de proteínas que reflejaron numéricamente mayor concentración en la época lluviosa fueron las bandas de proteínas de peso molecular 5.4, 6.5, 14.2, 19.9, 24.0 y 45.0 kDa, resaltándose esta última banda por sus cambios significativos $p < 0.05$ (Tabla 17), y en la época seca las bandas de proteína 29.0, 33.3, 35.1, 61.1, 66.0, 72.8 y 89.7 kDa. En esta época se expresaron tres bandas de proteínas que no se expresaron en la época lluviosa de pesos moleculares 17.1, 20.1, 36.0 kDa.

Tabla 16. Pesos moleculares, concentración y frecuencia de presentación y su correlación con calidad espermática de proteínas del plasma seminal de toros San Martinero y Cebú en la época lluviosa.

SAN MARTINERO			CEBÚ			CALIDAD ESPERMÁTICA		
Mr (kDa)	Concentración*	Frecuencia	Mr (kDa)	Concentración*	Frecuencia	Viabilidad	Motilidad	Concentración EPZ
89.7	1.86 ±0.71	21	89.70	2.485±0.51	21			
72.8	3.19±0.74	4		0	0			
66.0*	2.81±0.61 ^b	21	66.00	3.38±0.94 ^a	21			
61.1*	2.89±0.79 ^b	20	61.15	4.93±1.93 ^a	21			
45.0	4.12±1.50	14	45.00	3.31±1.40	21			
36.0	0	0	36.00	2.20±0.28	21			0.74**
35.1	4.28±2.17	20	35.10	3.42±1.14	21			
33.3	3.02±2.17	16	33.20	3.18±1.82	15	-0.58*	-0.60*	0.68*
29.0	8.52±2.39	21	29.00	7.37±1.58	21			0.48*
24.0	8.21±1.23	21	24.00	9.03±6.71	21			
19.9	23,0±0.54	5	19.90	0	0			
14.2	20.74±8.09	21	14.20	22.48±7.61	21			
6.5	8.92±2.24	21	6.50	9.63±4.16	21			
5.4*	3.34±0.30 ^b	4	5.40	5.43±1.07 ^a	7			

Promedios ± SEM (error estándar de la media). Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5. Los niveles de asociación se demarcan entre raza y calidad espermática en forma resaltada.

Finalmente, se aprecia una correlación positiva ($p < 0.05$, $r = 0.76$) entre el valor de concentración de la banda de proteína de peso molecular 19.9 kDa y el porcentaje de espermatozoides móviles en la época seca. (Tabla 17).

Por otra parte al analizar la frecuencia de las bandas de proteínas en la época seca, se observa que las que siempre se presentaron fueron las bandas 66, 36, 29, 24 y 14.2 kDa. Las de mayor frecuencia (mayores de 15 veces) fueron las bandas de 61.1 y 6.5 kDa y las de menor frecuencia (igual o menor de 7) fueron las bandas de 72.8, 45.0, 20.1, 19.9 y 5.4 kDa y cuando se compara con la época lluviosa (Figura 35), se observa que en las dos épocas en todos los animales experimentales se expresan las bandas de proteínas de peso molecular 66, 29, 24 y 14.2 kDa. Las proteínas que se presentaron en el total de animales experimentales en la época lluviosa y disminuyeron su frecuencia de presentación en la

época seca fueron las de peso molecular 89.7 y 6.5 kDa. En este sentido, al observar la frecuencia de proteínas que se no presentaron en la totalidad de los animales experimentales pero disminuyeron su frecuencia en la época seca, se detectan cinco bandas de proteínas de peso molecular de 72.3, 61.1, 45.0, 35.1 y 33.3 kDa. La única proteína cuya frecuencia se incrementó en la época seca fue la proteína de PM 19.9 kDa. Finalmente, al analizar las frecuencias de presentación general en las dos épocas se observa una disminución de la frecuencia de la época lluviosa a la seca en forma significativa $p < 0,05$ (Tabla 17, Figura 35).

Tabla 17. Pesos moleculares, concentración y frecuencia de presentación de bandas de proteínas del plasma seminal correlacionadas con la calidad espermática de toros San Martinero en la época lluviosa y seca.

UNIDAD	EPOCA LLUVIAS		EPOCA SECA		CALIDAD ESPERMÁTICA		
	Mr (kDa)	Concentración (%) [*]	Frecuencia	Concentración (%) [*]	Frecuencia	Viabilidad	Motilidad
89.7	1.86±0.71	21	2.644±0.580	15			
72.8	3.19±0.74	4	3.531±0.379	2			
66.0	2.81±0.61	21	3.686±0.680	21			
61.1	2.89±0.79	20	4.754±2.317	19			
45.0[*]	4.12±1.5 ^a	14	2.803±0.488 ^b	7			
36.0	0	0	3.507±1.498	21			
35.1	4.28±2.17	20	5.453±1.907	10			
33.3	3.02±2.17	16	3.461±1.383	12			
29.0	8.52±2.39	21	8.595±2.258	21			
24.0	8.21±1.23	21	6.480±1.566	21			
20.1	0	0	4.246±2.963	7			
19.9	2.30±0.54	5	2.10±0.55	8		0.76 [*]	
17.1	0	0	4.56±1.76	14			
14.2	20.74±8.09	21	17.35±5.14	21			
6.5	8.92±2.24	21	7.10±2.29	19			
5.4	3.34±0.30	4	3.21±1.87	4			

Promedios ± SEM (error estándar de la media). Diferentes tipos de letra indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5%. Los niveles de asociación se demarcan entre época y calidad espermática en forma resaltada

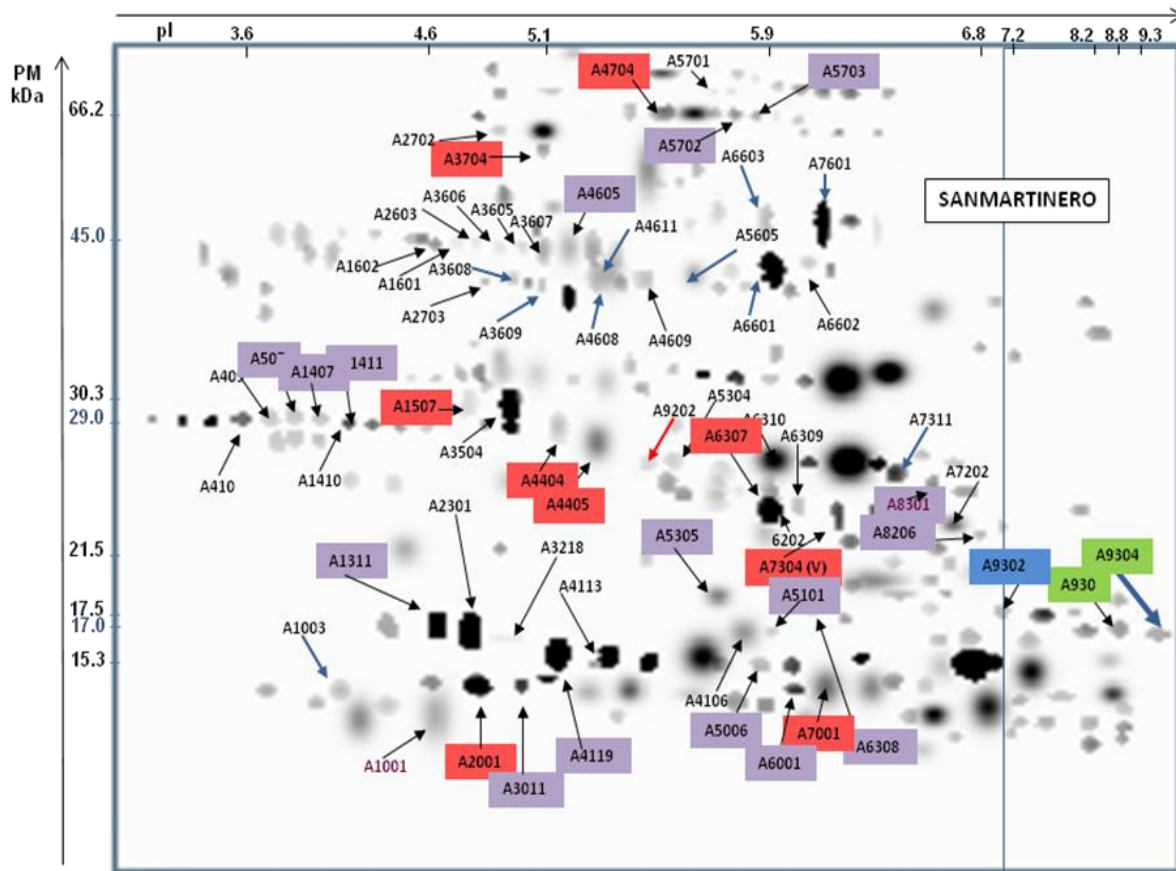


Figura 35. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de ganados de la raza San Martinero, donde 60µg de proteína fueron separados por electroforesis 2D. Se resaltan en el mapa las flechas azules y rojas que indican los puntos de proteína que se expresaron únicamente en la época lluviosa y seca respectivamente. Los puntos de proteína en recuadros verdes y azules señalan los puntos de proteínas básicas y neutras y los recuadros violeta y rojos son los puntos que más se repiten en la época lluviosa y seca respectivamente. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoelectricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa virtual

VI.2.2. ESTUDIO DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL POR ELECTROFORESIS 2D SDS – PAGE.

La información colectada de la separación de proteínas del plasma seminal permitió la construcción de mapas referenciales 2D-PAGE, de la raza San Martinero y la raza Cebú.

Cabe anotar que las definiciones que se señalaron para este estudio son la respuesta a similitudes o semejanzas en cuanto a posición de los puntos, similitud en los pesos moleculares y puntos isoelectricos con respecto a los reportados por algunos investigadores y

los registrados en la base de datos NCBI NR. Para la verificación se requieren de procedimientos de análisis bioquímicos de secuenciación mediante la espectrofotometría de masas de los que no se dispuso durante la realización de este estudio.

VI.2.2.1. Evaluación comparativa entre la época lluviosa y la época seca de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad spermática en ganado criollo San Martinero.

La señal de proteína en los geles de policrilamida registrados en el mapa referencial de los toros San Martinero estudiados para las dos épocas señala 64 puntos (98,46%) para la época lluviosa, de los 65 puntos detectados en las dos épocas, y 52 puntos (80%) para la época seca, de los cuales 51 puntos (78.46%) están presentes en las dos épocas (Tabla 18). 13 puntos de proteína (20%) se encuentran únicamente en la época lluviosa y 1 punto (1.85%) en la época seca. Para estas proteínas, los pesos moleculares registrados en el mapa de referencia oscilaron entre 13.8 y 66.65 kDa y los puntos isoeléctricos (pIs) se enmarcaron entre 3.59 y 9.8 de los cuales el 95% se localizó por debajo de la neutralidad ($pI < 7$) representando proteínas ácidas o ligeramente ácidas. Un 1.5% representó una proteína neutra de peso molecular 17.50 kDa y dos proteínas con ($pI > 7$), alcalinas o ligeramente alcalinas con pesos moleculares de 16.69 y 16.72 kDa y puntos isoeléctricos de 8.63 y 9.8 (Figura 35 y Tabla 18).

Para efectos de un mejor estudio comparativo de los 65 puntos de proteína en relación con la calidad espermática en las dos épocas, se determinó analizar las proteínas que superaran el valor del 20% de frecuencia de presentación, siguiendo el mismo criterio para la comparación entre razas (Tabla 18)

En la época lluviosa, de los puntos expresados, se reflejan las mayores concentraciones en seis puntos de proteínas codificadas como proteínas A2001, A4119, A1311, A3218, A2301 y A7304, y caracterizadas por su menor peso molecular entre los 14 y 24 kDa y pH ácidos, (14.02, 4.81), (15.46, 5.15), (16.95, 4.64), (16.24, 4.94), (16.74, 4.78) y (23.24, 6.24) kDa, respectivamente. Por otra parte, del total de la proteína cargada en el gel, estos puntos de proteína representan 3.6, 6.6, 7.1, 17.2, 18.2 y 4.41 % respectivamente. La sumatoria de estos 6 puntos de proteínas corresponde al 57.11% del total de proteína cargado.

Los puntos de proteína A2301, A3218 y A2001 se enmarcan como posibles BSP A1/ A2 y A3 (16.24kDa, 4.94), (16.74kDa, 4.78) y (14.02 kDa, 4.81). La sumatoria de concentraciones de estos puntos de proteína corresponde al 40.5% de las proteínas del plasma seminal. Es de anotar que las A1 y A2 son denominada como PDC 109. Sin embargo al analizar algunas proteínas cercanas a estas BSP, se observa que el punto de proteína A4119 (15.46kDa, 5.15), podría ser una de sus isoformas que incrementaría la sumatoria de concentraciones de las BSP al 47.16% y si no fuese así estaríamos frente a una nueva proteína. Los puntos de proteína A3704 y A2702, por su ubicación, nos podrían estar indicando la presencia de Osteopontina (Denhardt *et al.*, 2001, y Cancel *et al.*, 1997).

Resultados

Tabla 18. Masa relativa, punto Isoeléctrico, concentración y frecuencias de presentación de puntos de proteína del plasma seminal bovino San Martinero en la época lluviosa y seca.

Código	Mr	pI	ÉPOCA LLUVIOSA		ÉPOCA SECA		Código	Mr	pI	ÉPOCA LLUVIOSA		ÉPOCA SECA	
			Concentración %	Frecuencia	%	Frecuencia				Concentración %	Frecuencia	%	Frecuencia
1003	13.80	4.12	0.32	7			4404	27.99	5.16	1.51	7	4.76	17
6001	13.84	5.97	0.61	10	1.32	3	1411**	28.20	4.30	1.09	14	0.91	3
7001	13.94	6.15	0.68	13	1.02	14	1410	28.20	4.17	0.41	9	0.06	
2001	14.02	4.81	3.60	19	2.29	20	410	28.59	3.59	0.53	11	0.72	
3011**	14.02	5.00	1.17 ^b	21	2.94 ^a	16	409	28.62	3.74	1.20	18	0.42	
1001	14.17	4.62	0.42		0.62		1407	28.62	4.02	1.32	18	0.96	15
5006	14.91	5.87	1.01	17	1.01		507	28.74	3.87	1.55	19	1.22	17
4106	15.09	5.54	2.78	18	2.97	18	3504	28.98	4.95	0.68	12	2.31	
5101	15.30	5.71	2.75	21	2.62	16	1507**	29.48	4.77	1.32	8	2.24	19
4113	15.37	5.38	1.62	18	2.24	18	3609	37.98	5.09	0.52	9		
4119**	15.46	5.15	6.66 ^b	21	9.70 ^a	19	4609	38.55	5.53	1.15	6		
3218	16.24	4.94	17.25	21	17.16	21	2703	38.71	4.89	0.62	2		
930	16.69	8.63	1.14	11	1.62	2	3608	38.73	4.96	0.63	9		
2301**	16.74	4.78	19.20 ^a	21	11.84 ^b	21	4608	38.81	5.32	0.57			
9304	16.72	9.80	0.29	14			5605	39.08	5.69	0.44			
1311	16.95	4.64	7.31	16	4.62	12	4611	39.32	5.38	0.35			
9302	17.50	7.00	0.35	5	1.10		6601	39.88	5.91	0.71	6		
9303	17.67	5.74	0.55	5	1.58		6602	40.71	6.03	0.42		0.67	
6308	17.82	6.05	0.40	9	0.43	2	3607	42.52	5.09	0.54		1.06	
9202	26.10	5.40			1.16	5	4605	42.6	5.20	1.62	10	0.97	3
5305	18.51	5.75	0.46	14	0.88	2	3606	42.92	4.91	0.21	17	1.31	
8206	22.23	6.84	0.53	10	0.72	6	3605	42.92	5.00	0.31	15	1.03	
7304**	23.24	6.24	4.41 ^a	17	2.74 ^b	21	2603	43.46	4.80	0.38	15	0.57	
7202	22.70	6.72	0.59		0.41		1601	43.46	4.72	0.38		1.16	
7311	25.98	6.31	3.89	18			1602	43.57	4.63	0.07		0.12	
6309	25.97	6.02	0.94	18	0.64		6603	46.62	5.89	2.33	6		
6310	26.10	5.91	2.16	19	0.27		7601	46.62	6.12	2.22	6		
6202	23.61	5.98	0.53		0.91		3704	58.79	5.09	0.55	1	0.91	7
6307	24.35	5.9	2.46	14	1.82	18	2702	62.56	4.90	0.64		0.96	
5304	26.10	5.65	1.08	9	0.67		5703	65.29	5.86	0.40	12	0.22	2
8301	24.70	6.72	0.77	9	0.07	1	5702	65.66	5.80	0.43	5	0.52	4
4405	27.15	5.32	0.46	2	1.24	8	4704	66.20	5.60	1.55	20	1.04	8
							5701	66.65	5.75	0.12		0.12	

Códigos de proteínas resaltados representan sumatorias de frecuencias de presentación en las dos épocas >20%. Diferentes tipos de letra resaltadas dentro de filas indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5%.

Así mismo, Moura *et al.*, 2007a reportan ubicaciones parecidas a la A3704 como Nucleobindina. Las Osteopontinas están asociadas con toros de alta fertilidad, (Killian *et al.*, 1993, Cancel *et al.*, 1997, Moura *et al.*, 2005, 2006a y 2007a), y alta congelabilidad (Jobim *et al.* 2001). Además están asociadas con división y mayor producción de embriones *in vitro* (Moura *et al.* 2005, Killian *et al.* 1993) y junto con las Nucleobindinas, desempeñan un papel importante en la capacitación espermática (Souza *et al.*, 2011).

En el mapa referencial se observan además el punto A1411 y posiblemente A1407 y A507 registrados sobre el gel, con valores de peso molecular en kDa y pI 28,20/4.30, 28,62/4.02 y 28.74/3.87 que podrían identificarse como una BSP-30 que integrarían la familia de las BSP al igual que los puntos isoelectricos descritos anteriormente. De igual forma se observa el punto de proteína A7001 de peso molecular 13.94 kDa y punto isoelectrico de 6.15 similar al reportado por Moura *et al.*, (2007) como espermadhesina, los puntos A4609, A2793, A3608, A4608, A5605, A4611 y A6601 como clusterinas y la posición del punto de proteína A2001 por su cercanía a lo reportado por Moura, como una posible aSFP, proteína ácido del fluido seminal (Moura *et al.*, 2007). Esta posible espermadhesina es reportada como secretada por las glándulas accesorias y asociada con motilidad espermática (Tabla 18 y Figura 36 y 37).

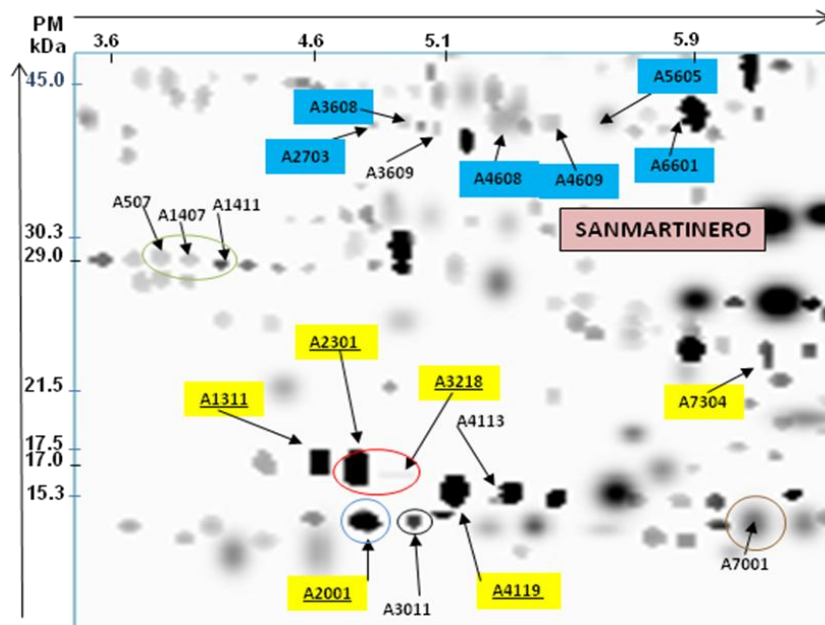


Figura 36. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de ganados de la raza San Martinero. Los códigos con recuadro de color amarillo señalan los puntos de proteína con mayor concentración. Los círculos rojo, azul, verde, café y negro identifican las PDC 109, la BSP A3, las BSP-30, espermadhesina y aSFP, respectivamente. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoelectricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura.

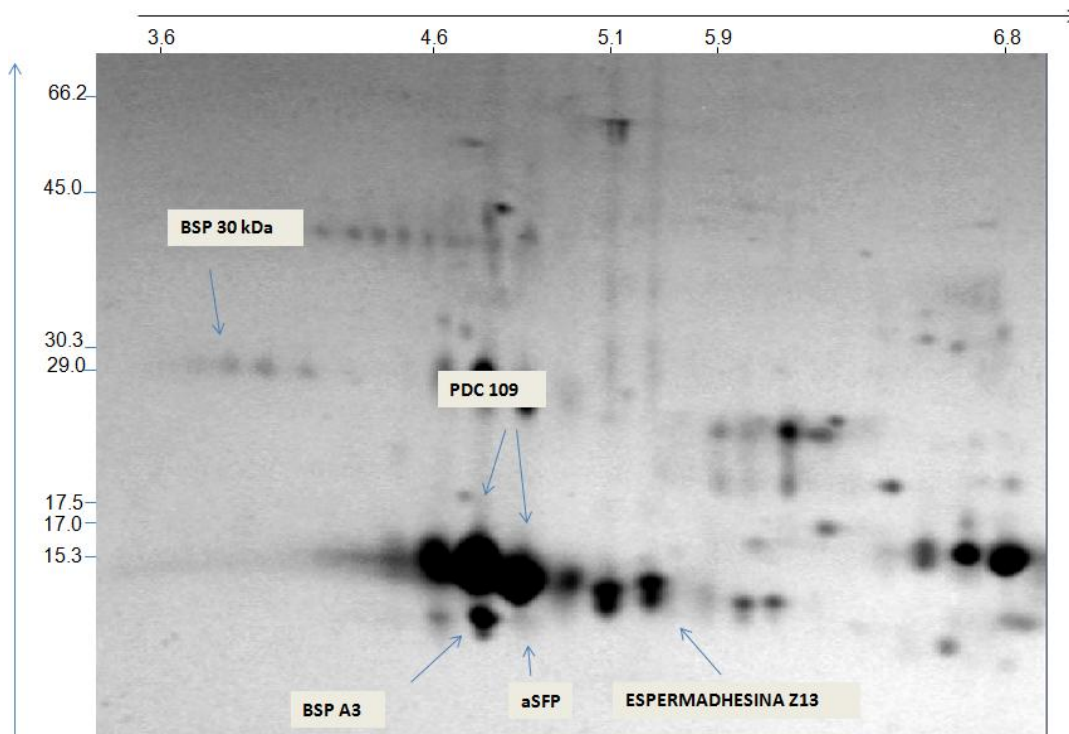


Figura 37. Mapa de puntos de proteínas plasma seminal de toro San Martinero. Las flechas señalan puntos que coinciden con la ubicación de las BSP A1/A2 (PDC 109), BSP A3, BSP-30 kDa, Espermadhesina Z13 y aSFP

Al realizar el análisis de medias entre la época lluviosa y la época seca, se observa variación en la concentración en forma altamente significativa ($p < 0.001$) de los puntos de proteína A2301, A3011, A4119 y A7304 con pesos moleculares en kDa y puntos isoelectricos (16.74/4.78), (14.02 / 5.00), (15.46 / 5.15) y (23.24 / 6.24), respectivamente. Los puntos A2301, similar a BSP A1, por su posición, y A7304 exhiben mayor concentración durante el periodo de lluvias, mientras que los puntos A3011 y A4119 lo hacen en la época seca. En la Tabla 19 se puede apreciar que el punto de proteína A3011 similar a aSFP, señala una asociación altamente significativa con la concentración de espermatozoides del eyaculado ($p < 0.001$, $r = 0.67$), y el punto de la proteína A4119 con la viabilidad espermática en forma altamente significativa ($p < 0.001$, $r = 0.51$). Lo mismo ocurre con el punto de proteína codificado como A5703 de peso molecular 65,29 kDa y punto isoelectrico 5.86, que a pesar de su baja frecuencia de presentación señala una asociación inversa en forma significativa ($p < 0.05$, $r = -0.39$) con viabilidad espermática.

Con respecto a los puntos de proteína A1411, A1407 y A507, con pesos moleculares y puntos isoelectricos de (28.20 y 4.30), (28.62 y 4.02), y (28.74 y 3.87), respectivamente,, se evidencia

un mayor porcentaje de concentración y una diferencia de frecuencia de presentación en el plasma seminal de los toros en la época de lluvias, en forma altamente significativa para la proteína A1411, ($p < 0.001$). El punto de proteína codificada como A1507 de peso molecular 29.48 y punto isoelectrico 4.77 se presenta en forma inversa a las proteínas A1411, A1407 y A507. En esta proteína la frecuencia es mayor en la época seca con respecto a la lluviosa ($p < 0.001$).

Tabla 19. Puntos de proteína de los toros San Martinero que se asocian a indicadores de eficiencia reproductiva.

Raza San Martinero			Indicadores de calidad espermática				
Puntos de proteína	Mr	pI	Concentración %	Concentración Epz / mL	Motilidad	Viabilidad	Morfología
3011	14.02	5.00	1.17	0.67**			
4119	15.46	5.15	6.66			0.51**	
A5703	65.29	5.86				-0.39	

Epz = Espermatozoides; (*) Diferencia significativa $p < 0.05$ y (**) diferencia altamente significativa $p > 0.001$.

De las proteínas seleccionadas por su frecuencia, de los 65 puntos de proteína registrados en el mapa electroforético, un grupo de siete proteínas codificadas como A1003, posibles clusterinas (A3609, A4609, A6601, como lo reporta Moura *et al.*, 2007) y A3608, A6603 y A7601 con pesos moleculares y puntos isoelectricos (13.8 y 4.12), (37.98 y 5.09), (38.55 y 5.53), (39.88 y 5.91), (38.73 y 4.96), (46.62 y 5.89) y (46.62 y 6.12), respectivamente, se detectaron solamente en la época de lluvias. Mientras que la proteína codificada con el número A9202 de peso molecular 26.10 y punto isoelectrico 5.40 se detectó únicamente en la época seca con una baja frecuencia (5 veces de 21). Otro grupo de 17 puntos de proteínas de éstas, seleccionadas y codificadas como A6001, A3011, A5006, A5101, A4119, A930, A1311, A6308, A5305, A8206, A8301, A1411, A1407, A507, A4605, A5703 y A5702 con pesos moleculares y puntos isoelectricos de (13.84 / 5.97), (14.02 / 5), (14.91 / 5.87), (15.3 y 5.71), (15.46 y 5.15), (16.69 y 8.63), (16.95 y 4.64), (17.82 y 6.05), (18.51 y 5.75), (2.23 / 6.84), (24.7 / 6.72), (28.2 / 4.3), (28.62 / 4.02), (28.74 / 3.87), (42.6 / 5.2), (65.29 / 5.86) y (65.66 / 5.8), respectivamente, se detectaron un mayor número de veces en la época de lluvias. De igual forma, 9 proteínas, se detectaron mayor número de veces en la época seca (A7001, A2001, A7304, A6307, A4405, A4404, A1507, A3704 y A4704), con pesos moleculares y puntos isoelectricos (13.94 y 6.15), (14.02 y 4.81), (23.24 y 6.24), (24.35 y 5.9), (27.15 y 5.32), (27.99 y 5.16), (29.48 y 4.77), (58.79 y 5.09) y (66.2 y 5.6), respectivamente (Tabla 18).

VI.2.2. Evaluación comparativa de proteínas del plasma seminal y su asociación con calidad espermática de los perfiles electroforéticos 2D del plasma seminal del ganado criollo San Martinero con Cebú Brahman.

Para realizar la comparación del perfil electroforético 2 D del ganado criollo San Martinero con el ganado Cebú, se estableció como época de estudio la lluviosa. En el ganado Cebú, al igual que en el San Martinero, se generó un mapa electroforético referencial 2D-PAGE (Figura 39 y Tabla 20). Además, para el estudio y análisis se establecieron en cada uno de los animales experimentales mapas similares.

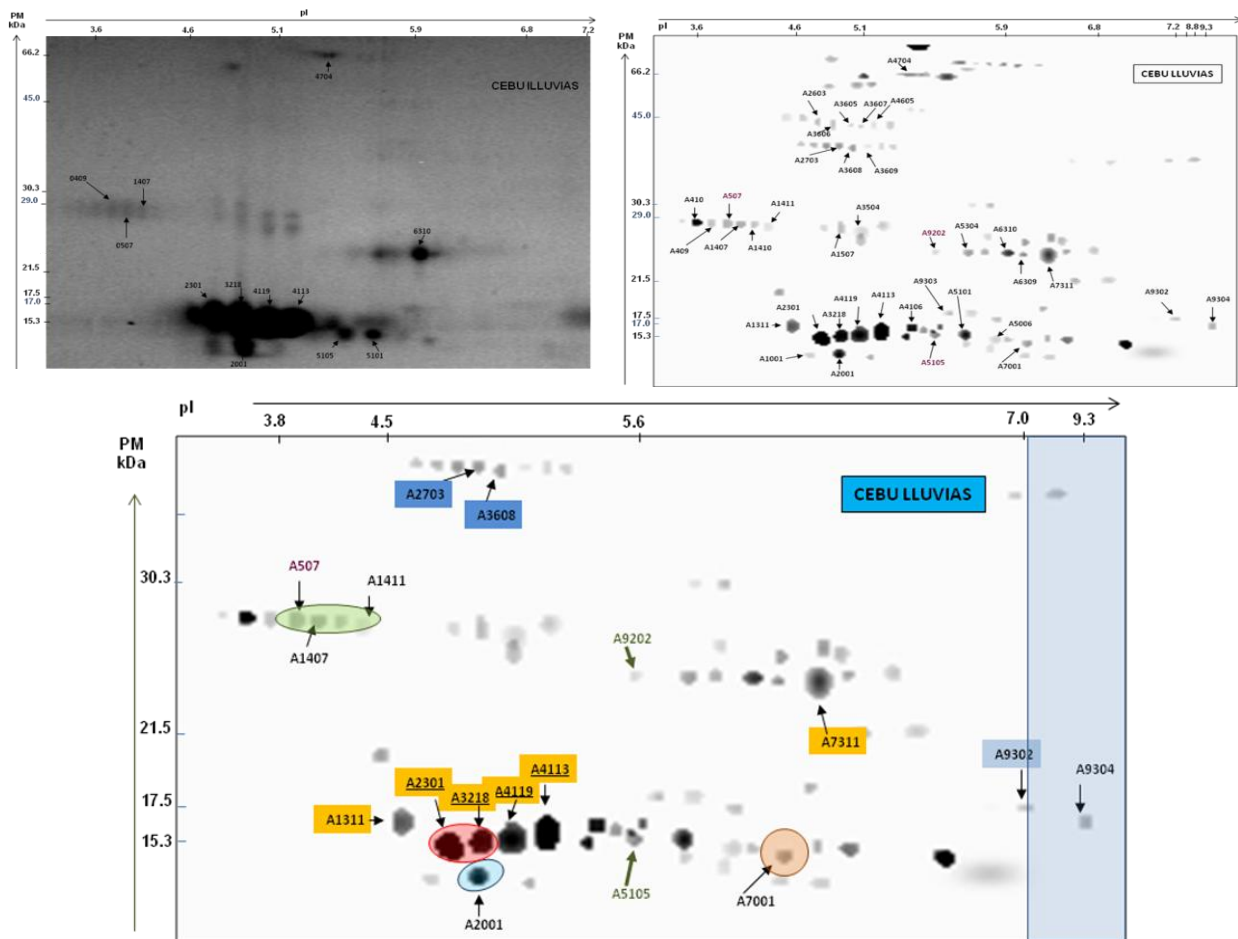


Figura 38. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de ganados de la raza Cebú. Los códigos con recuadro de color mostaza y azul señalan los puntos de proteína con mayor concentración y las posibles clusterinas. Los círculos rojo, azul, verde y café identifican a las posibles PDC 109, la BSPA3, las BSP-30 y espermadhesina, respectivamente, donde 60µg de proteína fueron separados por electroforesis 2D. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Arreglo de mapa real y virtual a nivel general y visualización de sección ampliada en mapa virtual ampliado.

Tabla 20. Masa relativa, punto Isoeléctrico y concentración de puntos de proteína del plasma seminal del ganado San Martinero comparado con el ganado Cebú.

Código	Mr	pI	SAN MARTINERO		CEBÚ		Código	Mr	pI	SAN MARTINERO		CEBÚ	
			Concentración %	Frecuencia	Concentración %	Frecuencia				Concentración %	Frecuencia	Concentración %	Frecuencia
1003	13.80	4.12	0.32				4404	27.99	5.16	1.51	7		
6001	13.84	5.97	0.61				1411	28.20	4.30	1.09	14	1.33	6
7001	13.94	6.15	0.68	13	1.21	6	1410	28.20	4.17	0.41	9	1.50	2
5105	14.61	5.64			2.84	3	410	28.59	3.59	0.53	11	1.72	12
2001	14.02	4.81	3.60	19	4.69	21	409	28.62	3.74	1.20	18	1.74	18
3011	14.02	5.00	1.17	21			1407	28.62	4.02	1.32	18	1.57	14
1001	14.17	4.62	0.42	8	2.67	16	507	28.74	3.87	1.55	19	1.81	18
5006	14.91	5.87	1.01	17	2.54	12	3504	28.98	4.95	0.68	12	2.94	14
4106	15.09	5.54	2.78	18	3.24	12	1507	29.48	4.77	1.32	8	4.34	13
5101	15.30	5.71	2.75	21	3.57	19	3609	37.98	5.09	0.52	9	1.11	2
4113**	15.37	5.38	1.62 ^b	18	11.77 ^a	20	4609	38.55	5.53	1.15	6		
4119**	15.46	5.15	6.66 ^b	21	15.51 ^a	21	2703	38.71	4.89	0.62	2	1.37	5
3218	16.24	4.94	17.25	21	14.73	21	3608	38.73	4.96	0.63	9	1.25	5
930	16.69	8.63	1.14	11			4608	38.81	5.32	0.57			
2301**	16.74	4.78	19.20 ^a	21	8.72 ^b	21	5605	39.08	5.69	0.44			
9304	16.72	9.80	0.29	14	1.77	5	4611	39.32	5.38	0.35			
1311	16.95	4.64	7.31	16	5.81	9	6601	39.88	5.91	0.71	6		
9302	17.50	7.00	0.35	5	1.35	7	6602	40.71	6.03	0.42			
9303	17.67	5.74	0.55	5	0.81	3	3607	42.52	5.09	0.54	13	1.14	7
6308	17.82	6.05	0.40	9			4605	42.60	5.20	1.62	10	0.79	4
9202	26.10	5.40			1.21	4	3606	42.92	4.91	0.21	17	1.44	8
5305	18.51	5.75	0.46	14			3605	42.92	5.00	0.31	15	1.36	7
8206	22.23	6.84	0.53	10			2603	43.46	4.80	0.38	15	1.54	5
7304	23.24	6.24	4.41	17			1601	43.46	4.72	0.38			
7202	22.70	6.72	0.59				1602	43.57	4.63	0.07			
7311	25.98	6.31	3.89	18	4.10	4	6603	46.62	5.89	2.33	6		
6309	25.97	6.02	0.94	18	1.02	5	7601	46.62	6.12	2.22	6		
6310*	26.10	5.91	2.16 ^b	19	3.39 ^a	21	3704	58.79	5.09	0.55	1		
6202	23.61	5.98	0.53				2702	62.56	4.90	0.64			
6307	24.35	5.90	2.46				5703	65.29	5.86	0.40	12		
5304	26.10	5.65	1.08	9	1.95	21	5702	65.66	5.80	0.43	5		
8301	24.70	6.72	0.77	9			4704*	66.20	5.60	1.55 ^b	20	2.85 ^a	14
4405	27.15	5.32	0.46	2			5701	66.65	5.75	0.12			

Diferentes tipos de letra resaltadas dentro de filas indican valores con diferencia significativa $p < 0.05$ (*) o altamente significativa $p < 0.001$ (**) a un α del 5%. Los valores resaltados en recuadros oscuros señalan los puntos de proteína propios para cada grupo de animales estudiado por raza.

Los puntos de proteínas detectados en la raza Cebú Brahman en el mapa electroforético se enmarcan en 37 registros, 27 menos que el San Martinero, con pesos moleculares entre 13.9 y 66.2 kDa, y pls entre 4.0 y 9.8 (Figura 39 y Tabla 20). El 94,4% de los puntos de proteínas tienen pl por debajo de 7 similar al San Martinero 94.59%, lo que indica que la gran mayoría de puntos de proteína tienen un pH ácido, o ligeramente ácido. El 5.41% está representado por un punto de proteína con pl neutro al igual que en el San Martinero y una con pl alcalino, uno menos que en el San Martinero. De los 37 puntos de proteína presentes en la Raza Cebú Brahman, 35 (94.5%) se encuentran presentes en las dos razas, San Martinero y Cebú (Tabla 20) y dos puntos (5.41%), se encuentran únicamente en la raza Cebú (Tabla 21).

Seis proteínas codificadas como A4113, A1311, A4119, A3218, A2301 y A7311 con pesos moleculares y puntos isoeléctricos (15.3 y 5.3), (16.95 y 4.64), (15.4 y 5.1), (16.2 y 4.9), (16.7 y 4.7) y (25.98 y 6.31), respectivamente, presentan el mas alto porcentaje de proteína en el plasma seminal de esta raza (11.77, 5.21, 15.51, 14.73, 8.72 y 4.11 %, respectivamente), de tal forma que entre las seis conforman el 60.05% del total de la proteína cargada, similar a las obtenidas en la raza San Martinero ($p > 0.05$).

La suma de las concentraciones de los posibles puntos de proteína A2301, A3218 y A2001, de pesos moleculares en kDa y puntos isoeléctricos (16.24 y 4.94), (16.74 y 4.78) y (14.02 y 4.81), en Cebú integrantes de la familia BSP como BSP A1/A2 y A3 corresponden al 28.13%, muy inferior al encontrado en el ganado San Martinero 40.5% ($p < 0.001$), sin embargo cuando a esta sumatoria se le incluye el punto de proteína A4119 como una posible isoforma de las BSP, la sumatoria alcanza 43,64 un poco por debajo al encontrado en Sanmartinero (47.16).

Por otra parte como se explico anterior mente este punto de proteína podría no ser una isoforma si no una nueva proteína que se expresa en el trópico bajo Colombiano, sería importante su secuenciación. Los puntos y la A507, A1407 y A1411 podrían corresponder a BSP 30 kDa. Se visualizan además en el mapa el punto de proteína A7001, similar al que reportan Moura *et al.*, (2007) como espermadhesina y la A3011 podría ser una aSFP. (Tabla 20).

Al realizar el análisis de medias entre raza, se observa mayor concentración para el Sanmartinero en la proteína A2301 y para el Cebú en las proteínas A4119 y A4113 de forma altamente significativa ($p < 0.001$) y los de los puntos de proteína A6310 y A470 indicaron diferencia significativ ($p < 0.05$) a favor del Cebú. Los análisis de asociación de proteínas con indicadores de calidad espermática en el Cebú indican que las proteínas A2001, A4113 y A6310 se correlacionan negativamente ($p < 0.05$, $r = -0.35$, $p < 0.001$, $r = -0.69$, $p < 0.05$, $r = -0.37$), respectivamente, con la concentración de espermatozoides del semen eyaculado.

Por el contrario, el punto de proteína A2301 (PM 16.74 y pl 4.78) se correlaciona directamente con concentración ($p < 0.05$ $r = 0.48$). La proteína A4113, además, se correlaciona en forma inversa con motilidad ($p < 0.05$: $r = -0.36$), al igual que el punto de proteína A409 ($p < 0.05$ $r = -0.38$, Tabla 21).

Tabla 21. Puntos de proteína de los toros Cebú que se asocian a indicadores de eficiencia reproductiva a este nivel de selección.

Raza Cebú			Indicadores de calidad espermática			
Puntos de proteína	Mr	pI	Concentración %	Concentración Epz / mL	Motilidad	Viabilidad Morfología
A2001	14.02	4.81	4.69	-0.35*		
A4113	15.37	5.38	11.77	-0.69**	-0.36*	
A6310	26.10	5.91	3.9	-0.37*		
A2301	16.74	4.78	8.72	0.48*		
A409	28.62	3.74	1.742		-0.38	

Epz: Espermatozoides; (*) Diferencia significativa $p < 0.05$ y (**) diferencia altamente significativa $p > 0.001$.

VI. 3. ANÁLISIS DE CALIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE GRUPOS DE PROTEÍNAS CON FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN MAYOR AL 70%.

VI.3.1. ESTUDIOS POR ÉPOCA

Para efectos del análisis solo se tuvieron en cuenta aquellos puntos cuya frecuencia de presentación estaba por encima del 70% de presentación en la época (Tabla 22).

Tabla 22. Frecuencias de presentación de los puntos de proteína del plasma seminal del ganado San Martinero en la época lluviosa y seca.

Código	Mr	pI	Epoca lluviosa	Epoca seca
			Frecuencia	Frecuencia
2001	14.02	4.81	19	20
3011	14.02	5	21	16
5006	14.91	5.87	17	15
4106	15.09	5.54	18	18
5101	15.3	5.71	21	16
4113	15.37	5.38	18	18
4119	15.46	5.15	21	19
3218	16.24	4.94	21	21
2301	16.74	4.78	21	21
7304	23.24	6.24	17	21
6307	24.35	5.9	14	18
1407	28.62	4.02	18	15
507	28.74	3.87	19	17

VI.3.1.1. Comportamiento de las variables de calidad espermática en fresco, asociadas a grupos de proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa

Las proteínas del plasma seminal seleccionadas en el ganado criollo San Martinero con más del 70% de presentación en ambas épocas fueron la A3011 (pm 14.02 y pl 5), A5006 (pm 14.91 y pl 5.87), A4106 (pm 15.09 y pl 5.54), A7304 (pm 23.24 y pl 6.24), A6307 (pm 24.35 y pl 5.9), A2001 (pm 14.02 y pl 4.81), A5101 (pm 15.3 y pl 5.71), A4113 (pm 15.37 y pl 5.38), A4119 (pm 15.46 y pl 5.15), A3218 (pm 16.24 y pl 4.94), A2301 (pm 16.74 y pl 4.78), A1407 (pm 28.62, / pl 4.02), A507 (pm 28.74 / 3.87), las cuales se pueden observar en la Tabla 22, en un mapa virtual Master generado y en la imagen real de un registro del plasma seminal de un toro que presenta todas las proteínas seleccionadas (Figura 39).

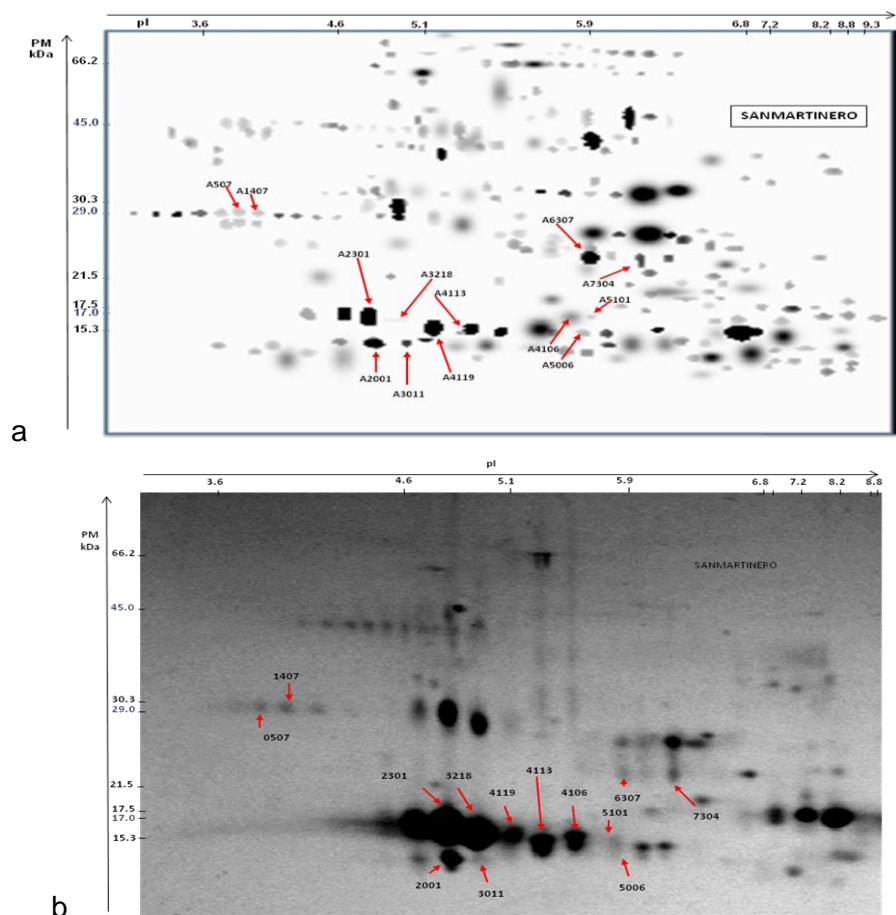


Figura 39. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. a. Puntos de proteínas en Mapa Master Virtual generado a través del software PD-Quest de BIO-RAD que resalta los 13 puntos de proteína seleccionados por su frecuencia b. Registro de mapa real. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura a y b.

Para la evaluación de la calidad espermática en fresco se han considerado las variables volumen seminal, concentración espermática, motilidad, viabilidad, morfología índice de calidad espermática, y producción espermática de buena calidad reflejada en el número de pajillas congeladas a 60×10^6 epz/mL (Tabla 23.).

Tabla 23. Efecto de la época lluviosa o seca sobre la calidad espermática de toros San Martineros.

Variable de calidad espermática	N	Epoca Lluviosa	n	Epoca Seca	P
Volumen Seminal (mL) *	21	$9.36^a \pm 1,97$	21	$6.12^b \pm 2,49$	0.003
Concentración (epzX10 ⁶)/mL	21	$996.38^a \pm 122$	21	$1.083.00^a \pm 182$	0.063
Motilidad (%)	21	$82.62^a \pm 3.75$	21	$76.90^a \pm 14.53$	0.122
Viabilidad (%)	21	$75.57^a \pm 4.27$	21	$69.48^a \pm 15.27$	0.070
Morfología (% epz normales)	21	$86.19^a \pm 6.67$	21	$82.10^a \pm 6.56$	0.211
ICE (conc,mot,viab, morfl)	21	$0.54^a \pm 0.33$	35	$0.49^a \pm 0.17$	0.238
Epz congelables (N° pajillas) *	21	$166.06^a \pm 35.54$	21	$101.1^b \pm 57.60$	0.003
Epz congelables (N° pajillas/mL)	21	$17.9^a \pm 2.80$	21	$16.2^a \pm 5.70$	0.003
Epz congelables /mL	21	$537^a \times 10^6 \pm 84 \times 10^6$	21	$486^a \times 10^6 \pm 171 \times 10^6$	0.223

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0,05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0,001$) representado por (**). Las pajillas para congelación se empacaron a 0×10^6 epz/MI. ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermatica

Los resultados obtenidos por efecto de la época lluviosa o seca sobre la calidad espermática en semen fresco señalan en términos generales un comportamiento similar de los promedios de las variables concentración, motilidad, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática ($p > 0.05$). Sin embargo, para los promedios de la variable volumen seminal (9.36 ± 1.97 vs 6.12 ± 2.49 y número de espermatozoides congelables expresados en pajillas de 30×10^6 espermatozoides (166.06 ± 35.54 vs 101.1 ± 57.60) se observó un efecto negativo de la época seca en forma significativa ($p < 0.05$). Cuando este cálculo de pajillas se realizó por ml de semen se observó que no era afectado por la época (Tabla 23).

VI. 3.1.1.1. Volumen seminal

Análisis del comportamiento del volumen seminal entre épocas

El análisis del comportamiento del volumen seminal entre épocas mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permite determinar que el mejor arreglo de covarianzas se obtiene a partir del modelo VCA el cual expresa el menor BIC (178.3), estimando así la mejor estructura de los errores estándar para las comparaciones del efecto de la época, repetición y su interacción.

Con este modelo se puede explicar con mayor aproximación que la época de evaluación afectó el volumen seminal ($Pr > F$ 0,0028), mientras que las repeticiones y su interacción no presentaron efecto ($Pr > F$, 0.5503 y 0.5924 respectivamente) (Tabla 24).

Tabla 24. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre volumen seminal mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	178.8	207.3	178.3
EPOCA	0.0026	0.0026	0.0028
REPETICION	0.5478	0.5477	0.5503
REPETICION*EPOCA	0.5980	0.5942	0.5924

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*.

El promedio general del volumen seminal para la época lluviosa fue de 9.36 ± 1.97 ml, y para la época seca de 6.12 ± 2.49 ml ($p < 0.05$) (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en el comportamiento de volumen seminal

Determinado el modelo, la selección de las proteínas o grupos de proteínas que podrían explicar en parte los cambios observados en la variable volumen seminal fue estudiada inicialmente mediante ecuaciones de predicción, modelo de regresiones polinomiales, con todas las proteínas seleccionadas con el fin de establecer el valor que cada una de éstas ejerce sobre la variable respuesta.

Los resultados obtenidos, a pesar de la diferencia entre épocas, indican únicamente a nivel general un modelo con cambios significativos ($Pr > F$ 0.0496, un R^2 de 0.6577 y un ajustado de 0.4399). Con este nivel de confianza del modelo podemos explicar que las proteínas A4113,

A507 y A5006 tienen un efecto inversamente proporcional a los cambios observados en el volumen seminal, mientras que la A4119, A2301, A1407 y A2001 tienen un efecto positivo. Las proteínas que señalan cambios significativos son la A4113 y la A2301. Cuando el análisis se realiza en forma independiente por época, los modelos de regresión polinomial no pueden explicar el comportamiento del volumen (Tabla 25).

Tabla 25. Estadísticos para determinar el comportamiento del volumen seminal a través de las proteínas seleccionadas mediante el modelo de regresión polinomial.

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.0496		0.2124		0.8243	
R ²	0.6577		0.9889		0.6085	
R ² ajustado	0.4399		0.9114		-0.7619	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	6.6864	0.0785	0.65095	0.8718	4.8365	0.5785
A4119	0.03589	0.8318	-0.84791	0.1662	0.0996	0.8365
A4113	-0.99536	0.0395	6.5373	0.1405	-0.79612	0.6423
A507	-0.75655	0.4915	0.55426	0.4893	-0.08682	0.9943
A2301	0.22223	0.0217	-0.05602	0.4245	0.21242	0.7996
A5006	-2.94607	0.0640	1.06583	0.4815	-2.70754	0.6303
A1407	1.94677	0.1275	1.13727	0.1874	0.9205	0.9707
A2001	0.00408	0.9915	1.36194	0.1549	0.01832	0.9925

Dada la posibilidad de no poder desarrollar modelos de predicción que comprometan las proteínas dentro de las épocas, se seleccionaron aquellas proteínas que se deberían incluir en el modelo a través del análisis de componentes principales (ACP), el cual permite visualizar en relación multidimensional el posible efecto principal. La selección por ACP involucra a las proteínas A4113, A507, A2301, A5006, A1407 y A2001 con una explicación de la variación del 55.2% (Figura 40).

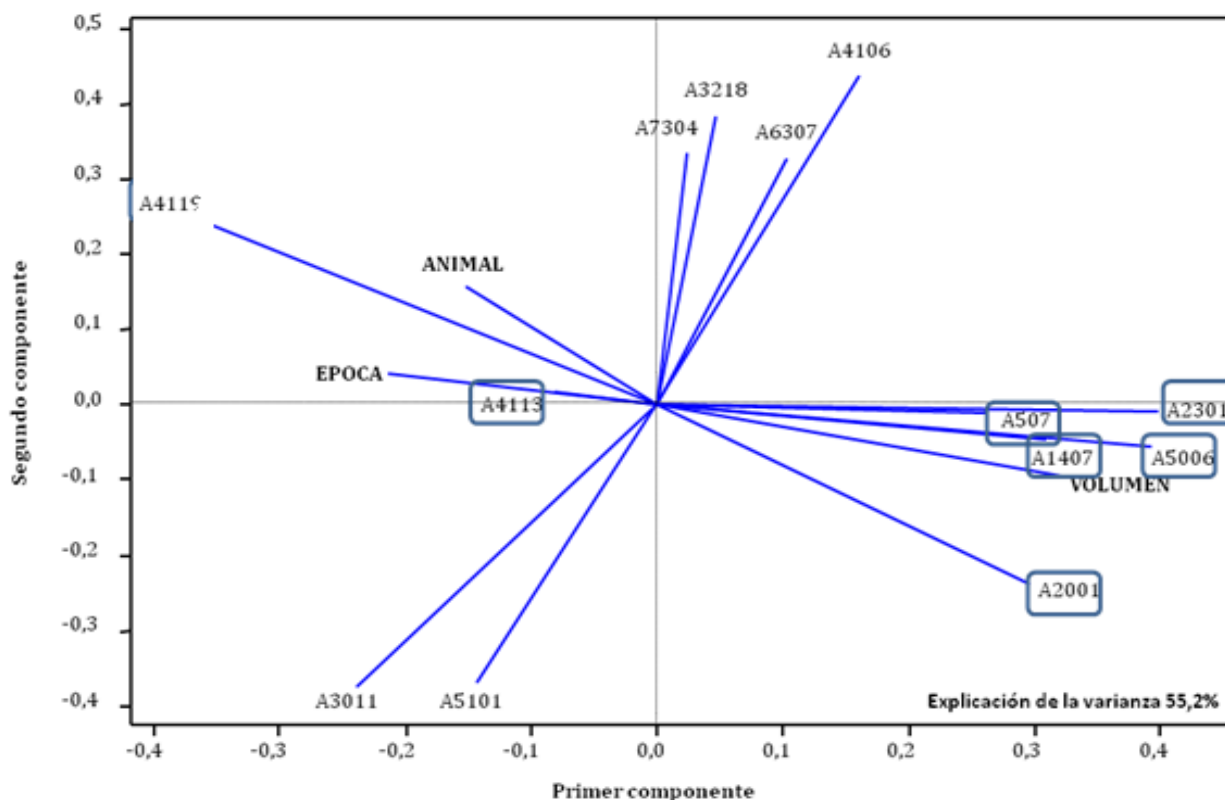


Figura 40. Proteínas que intervienen en la expresión del volumen seminal a través del análisis de componentes principales.

Considerando las proteínas seleccionadas por componentes principales y al hacer el análisis nuevamente mediante el modelo de regresión lineal múltiple y mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción del volumen seminal, la única proteína asociada de forma muy débil sin considerar el efecto de la época fué la A2301 ($p < 0.05$) y para la época de lluvia y seca no se pudo establecer ninguna proteína relacionada (Tabla 26).

Tabla 26. Estadísticos para determinar el comportamiento del volumen seminal a través de las proteínas seleccionadas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS.

	General	Lluvias	Seca			
Pr > F	0.0395	0.1348	n.e.			
R ²	0.2263	0.4936	n.e.			
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	4.69981	0.0039				
A2301	0.1713	0.0395			.	.

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre el volumen seminal y la concentración de las proteínas seleccionadas a partir de los anteriores procedimientos, a nivel general se observa que las respuestas de salida señalan con cierta asociación a las proteínas A4113 ($r = -0.31$, $p = 0.0660$) y A2301 ($r = 0.30$, $p = 0.0556$).

Finalmente, podemos precisar que los puntos de proteína que probablemente pudieran exponer los cambios contemplados en el volumen seminal de semen fresco podrían estar explicados por los puntos señalados en el gel en forma significativa (Figura 41) y enunciados de forma resaltada en el modelo de volumen referido a continuación.

VOLUMEN = $6.69 - (A4113 * 0.99536) + (A2301 * 0.0217) - (A507 * 0.75655) + (A4119 * 0.03589) - (A5006 * 2.94607) + (A1407 * 1.94677) + (A2001 * 0.00408)$
 $Pr > F 0.0496$, $R^2 = 0.6577$

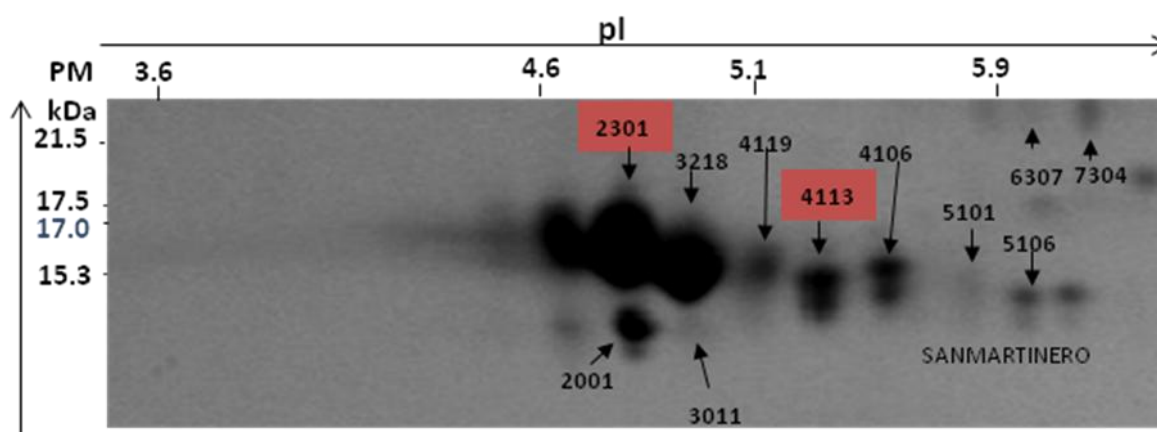


Figura. 41. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros raza San Martinero. Puntos de proteína en recuadros que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios del volumen seminal. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4113 y A2301) de uno de los registros de mejor imagen del estudio.

VI. 3.1.1.2. Concentración espermática $\times 10^6$

Análisis del comportamiento de la concentración espermática entre épocas

En la Tabla 27 se pueden apreciar los diferentes arreglos de covarianzas para los efectos de la época. El VCA elegido expresa el mejor BIC (477) y mediante este modelo no se observa efecto de la época de evaluación, de las repeticiones y de la interacción sobre la concentración espermática ($Pr > F 0.0632$, 0.2103 y 0.0719 , respectivamente).

Tabla 27. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la concentración espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	480.1	508.4	477.4
EPOCA	0.0664	0.0664	0.0632
REPETICION	0.2240	0.2915	0.2103
REPETICION*EPOCA	0.0605	0.0198	0.0719

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la concentración espermática para la época lluviosa señala $996.38 \pm 122.18 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro y para la seca de $1.083.00 \pm 182.95 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en los cambios de la concentración espermática

Al hacer el análisis mediante un modelo de regresión polinomial, en la Tabla 28 se pueden visualizar los resultados que muestran, a nivel general, proteínas como la A4113 y A2301 con efecto de forma inversa ($p < 0.05$), y la proteína A7304 con efecto en forma directa ($p < 0.05$) sobre concentración espermática. Por otra parte, la proteína A5006 podría estar involucrada aunque su significancia está un poco por encima del nivel considerado ($p = 0.064$). El modelo para cada una de las épocas no puede explicar el comportamiento de la concentración.

Tabla 28. Estadísticos para determinar el comportamiento de la concentración espermática con las proteínas seleccionadas a través del modelo de regresión polinomial

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.0343		0.3658		0.4129	
R ²	0.4485		0.9659		0.8588	
R ² ajustado	0.0976		0.7271		0.3648	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	1055.4957	0.0785	970.34273	0.2286	1335.7518	0.0472
A4119	10.29142	0.8318	95.32844	0.1687	0.44732	0.9818
A4113	-3.6034	0.0395	-377.8747	0.2657	-24.04294	0.7277
A507	-45.7945	0.4915	-229.737	0.1657	38.14401	0.9386
A2301	-8.59601	0.0217	12.3926	0.2457	2.02659	0.9523

<u>A5006</u>	<u>12.01601</u>	<u>0.0640</u>	21.17581	0.8839	-225.3389	0.3705
A1407	23.90395	0.1275	28.43671	0.6019	-228.3514	0.8250
A2001	49.87014	0.9915	-24.56316	0.6394	48.48938	0.5648
<u>A7304</u>	<u>42.66844</u>	<u>0.0471</u>	16.3826	0.1456	1.90265	0.6223

El modelo generado de este análisis se expresa como:

$$\text{Concentración} = 1055.50 \times 10^6 - (\mathbf{A4133} * 3.6034) - (\mathbf{A2301} * 8.59601) + (A5006 * 12.0160) + (\mathbf{A7304} * 42.6684) \quad \text{Pr} > F \ 0.0343 \quad R^2 \ 0,45$$

Con el propósito de la búsqueda de un mejor modelo que explique el comportamiento de la concentración espermática, se realizó un análisis mediante el procedimiento de STEPWISE de SAS con un grupo de proteínas seleccionadas por análisis de componentes principales. Los resultados muestran que las proteínas A5006, A7304 y A1407 podrían explicar el comportamiento de la concentración espermática a nivel general (Pr>F 0.0013 R² 0.95) (Tabla 29). Sin embargo, a pesar de la no diferencia entre épocas de la concentración espermática, al analizar solo lluvias se observa que la proteína A2001 podría explicar en forma directa para esta época los cambios en concentración espermática y para la época seca la proteína A2301 en forma inversa.

Tabla 29. Estadísticos para determinar el comportamiento de la concentración espermática a través de las proteínas seleccionadas mediante el procedimiento de STEPWISE de SAS.

	General	Lluvias	Seca
Pr > F	0.0013	0.0200	0.0300
R ²	0.9476	1.0000	0.7312

Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	1204.084	<.0001	716.20471	0.0020	1344.9331	<.0001
<u>A5006</u>	<u>-246.80254</u>	<u>0.0022</u>				
<u>A7304</u>	<u>32.66844</u>	<u>0.0282</u>				
<u>A1407</u>	<u>-116.61404</u>	<u>0.0037</u>				
<u>A2001</u>	.	.	<u>128.19521</u>	<u>0.0020</u>		
<u>A2301</u>	<u>-13.15886</u>	<u>0.0300</u>

Del análisis anterior se generarían los siguientes modelos:

$$\text{Concentración General} = 1204.084 - (A5006 * 246.80254) + (A7304 * 32.66844) - (A1407 * 116.61404) \quad \text{Pr} > F \ 0.013. \ R^2 = 0.9476 \quad \text{Pr} > F \ 0.013 \quad R^2 \ 0.95$$

$$\text{Concentración época lluviosa} = 716.205 + (A2001 * 128.19521) \quad \text{Pr} > F \ 0.020. \ R^2 = 1.0$$

$$\text{Concentración época seca} = 1344.9331 - (A2301 * 13.15886) \quad \text{Pr} > F \ 0.030. \ R^2 = 0.7312$$

Por otra parte, al calcular el coeficiente de correlación parcial se observa a nivel general que un punto codificado como A3011 señala asociación significativa y directa con la concentración espermática ($r = 0,6193$, $p < 0,05$)

Finalmente, podemos definir que los puntos de proteína que posiblemente expliquen con mayor fortaleza los cambios en concentración espermática del semen fresco probablemente estén asociados en forma significativa a los puntos señalados en el gel (Figura 42).

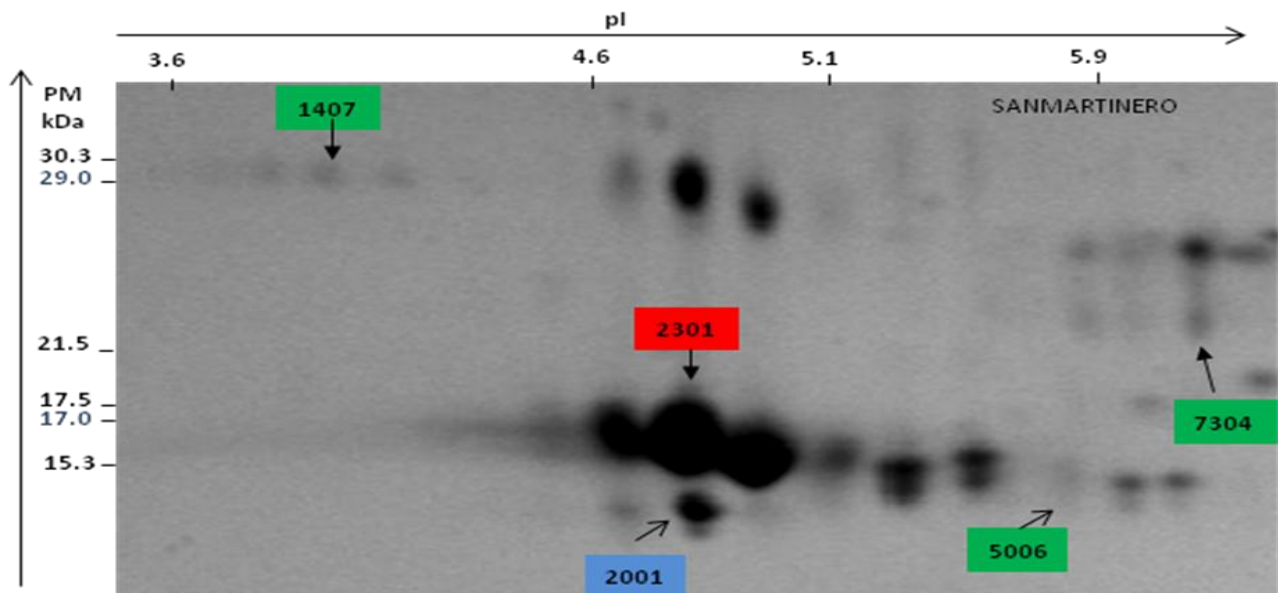


Figura 42. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de ganados de la raza San Martinero, Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de la concentración espermática. A nivel general se identifican con recuadros verdes, para la época lluviosa con recuadros azules, y para la época seca con recuadros rojos. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoelectricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A1407, A5006, A7304 A2001 Y A2301).

VI. 3.1.1.3. Motilidad espermática

Análisis del comportamiento entre época en la motilidad espermática

La evaluación del efecto de la época sobre el comportamiento de motilidad espermática se puede observar en la Tabla 30, en donde el arreglo VCA genera su mejor BIC, indicando que la variable motilidad no es afectada por la época ($p > 0.05$). Con estos modelos mixtos con medidas repetidas, se puede explicar con mayor aproximación que la época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre la motilidad espermática ($Pr > F$ 0,1217, 0,5934 y 0,4280, respectivamente) (Tabla 30).

Tabla 30. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la motilidad espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	292.0	316.2	290.2
EPOCA	0.0639	0.0639	0.1217
REPETICION	0.6360	0.4135	0.5934
REPETICION*EPOCA	0.4760	0.3692	0.4280

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la motilidad espermática para la época lluviosa fue de $82,62 \pm 3,75\%$ y para la seca de $76,90 \pm 14,53\%$ (Tabla 23.)

Participación de las proteínas seleccionadas en la motilidad espermática

Siguiendo el mismo procedimiento de selección de las variables por análisis de componentes principales (ACP), los puntos de proteína A7304, A3218, A6307, A4106, A3011 y A5101 resultan como seleccionados con una explicación de la variación del 54,8% y al hacer seguidamente el análisis con estas proteínas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción de la motilidad espermática, se observa a nivel general que el punto A6307 (Tabla 31) señala algún nivel de compromiso con el comportamiento de la motilidad espermática ($p < 0.05$), pero con un modelo de poca fortaleza ($R^2 = 0.23$).

Tabla 31. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la motilidad en razón a la concentración de las proteínas seleccionadas por ACP.

		General
Pr > F		0.0432
R ²		0.2316
Variable	Estimado	Pr > F
Término independiente	66.55457	<.0001
A6307	5.26816	0.0432

Al hacer nuevamente el análisis mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción de la motilidad involucrando todos los puntos de proteína, la respuesta indica que los puntos que explican esta variable son los puntos de proteína A7304 y A2001 en forma inversa y el punto de proteína A6307 en forma directa (Tabla 32).

Tabla 32. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la motilidad espermática por efecto de los puntos proteínas seleccionadas.

	General	Lluvias	Seca			
Pr > F	0,0047	n.e.	n.e.			
R ²	0,9969	n.e.	n.e.			
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	75.32838	0.0002				
A2001	-1.83573	0.0324				
A7304	-5.42565	0.0053				
A6307	14.89989	0.0019				

Por otra parte, al calcular el coeficiente de correlación parcial entre la concentración de la proteína seleccionada por este modelo y la motilidad espermática, a nivel general se observa una asociación directa significativa de la proteína A6307 ($r=0.46$, $p<0.05$).

Por último, podemos precisar que los puntos de proteína que posiblemente indiquen los cambios observados en la variable de motilidad espermática en el semen fresco podrían estar asociados a los puntos señalados en el gel en forma significativa (Figura 43), y descritos

de modo resaltado en el modelo de motilidad espermática más sensible encontrado y referido a continuación.

$$\text{Motilidad} = 75,32838 - (\mathbf{A2001} * 1.83573) - (\mathbf{A7304} * 5.42565) + (\mathbf{A6307} * 14.89989)$$

$$\text{Pr} > F \ 0.0047, R^2 = 0.9969$$

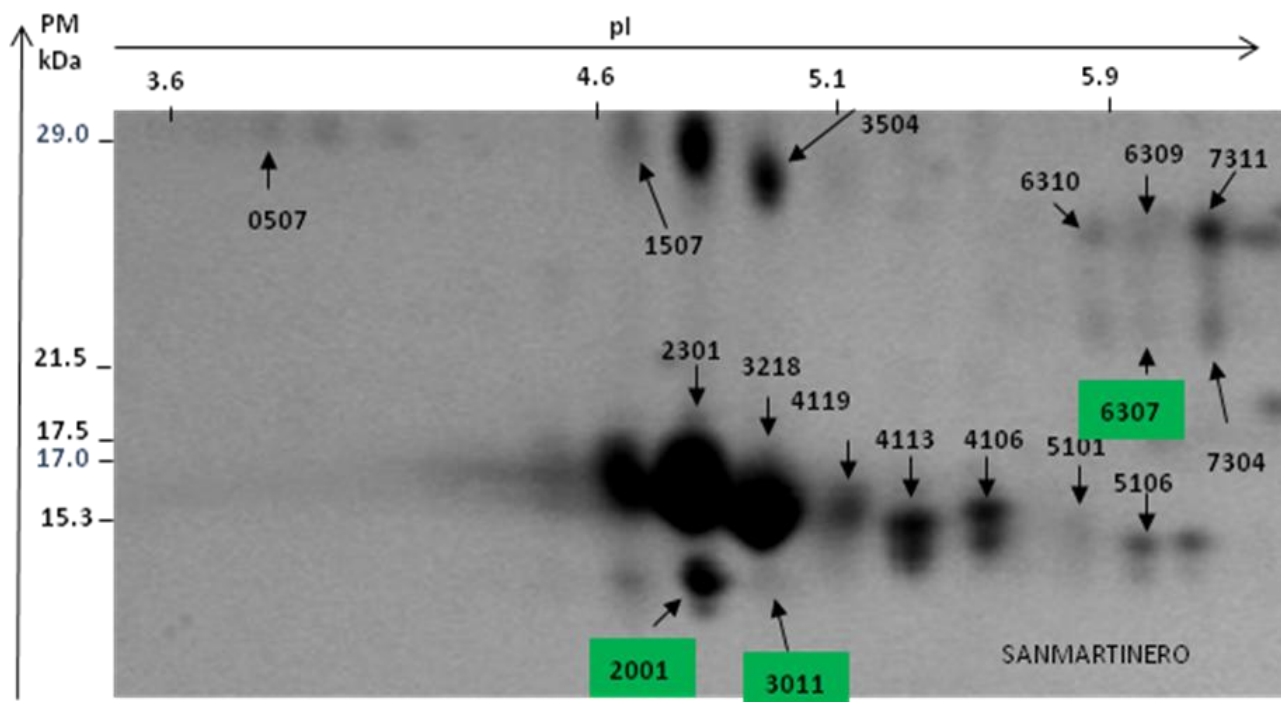


Figura 43. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de la motilidad espermática se señalan en recuadro verde. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A42001, A7304 y A6307).

VI. 3.1.1.4. Viabilidad espermática

Análisis del comportamientos entre época de la viabilidad espermática

En la Tabla 33 podemos observar el análisis de la viabilidad espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo a partir del modelo VCA. Los resultados indican que la época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre la viabilidad espermática ($\text{Pr} > F$ 0,0703, 0,3742 y 0,8719, respectivamente).

Tabla 33. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la viabilidad espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	298.0	311.3	293.9
EPOCA	0.1025	0.1025	0.0703
REPETICION	0.5177	0.2333	0.3742
REPETICION*EPOCA	0.9161	0.7196	0.8719

BIC – Criterio de inrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios de la viabilidad espermática para la época lluviosa fueron de $75.57 \pm 4.27\%$ y de $69.48 \pm 15.27\%$ para la seca (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en la viabilidad espermática

En la Tabla 34 se puede visualizar el análisis de los puntos de proteínas seleccionadas mediante un modelo de regresión polinomial, que señala $Pr > F$ de 0.0769 a nivel general sin considerar la época con un R^2 de 0.6222 y ajustado de 0.3818. Bajo estos criterios las proteínas que podrían estar señalando cambios en el comportamiento de la viabilidad serían la A2301 y la A1407.

Con el propósito de lograr un mejor análisis de la asociación de los puntos de proteína sobre la viabilidad espermática, se realizaron evaluaciones por ACP, procedimientos de STEPWISE de SAS y de cálculo de coeficiente de correlación parcial, pero los resultados obtenidos no explican el comportamiento de esta variable en forma significativa.

Tabla 34. Estadísticos para determinar el comportamiento de la viabilidad espermática a través de las proteínas seleccionadas mediante el modelo de regresión polinomial.

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.0769	0.2041	0.6363
R ²	0.6222	0.9898	0.7490
R ² ajustado	0.3818	0.9183	-0.1293

Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	44.76245	0.0785	73.14122	0.0551	44.92004	0.2446
A507	-0.75725	0.8318	1.1309	0.4816	-8.43606	0.8532
A2301	0.1165	0.0395	-0.44419	0.1243	0.14645	0.9624
A5006	0.47023	0.4915	-0.64324	0.8022	-7.22133	0.7273
A1407	7.02086	0.0217	4.06805	0.1065	19.09105	0.8399
A2001	2.62437	0.0640	1.08642	0.3533	4.33297	0.5735
A4113	3.70841	0.1275	6.89926	0.2551	4.13774	0.5306
A4119	0.94476	0.9915	-1.01927	0.2653	0.85663	0.6443
A7304	2.62437	0.0640	1.08642	0.3533	4.33297	0.5735
A6307	3.70841	0.1275	6.89926	0.2551	4.13774	0.5306
A3318	0.94476	0.9915	-1.01927	0.2653	0.85663	0.6443

Finalmente al revisar los análisis realizados, podemos definir que los puntos de proteína que posiblemente pueden interpretar los cambios observados en la viabilidad espermática en semen fresco podrían estar explicados por los puntos señaladas en el gel (Figura 44) en forma significativa y expresados de modo resaltado en el modelo de viabilidad con una significancia de Pr>F 0.0769 y un R² = 0.62 y descrita como:

$$\text{Viabilidad} = 44.76245 + (\mathbf{A2301*0.1165}) + (\mathbf{A1407*7.0203}) - (A507*0.7573) + (A5006*0.4702) + (A2001*2.6244) + (A4113*3.7084) + (A4119*0.9448) + (A7304*2.6244) + (A6307*3.7084) + (A3318*0.9448)$$

$$\text{Pr}>F 0.0769; R^2 = 0.62$$

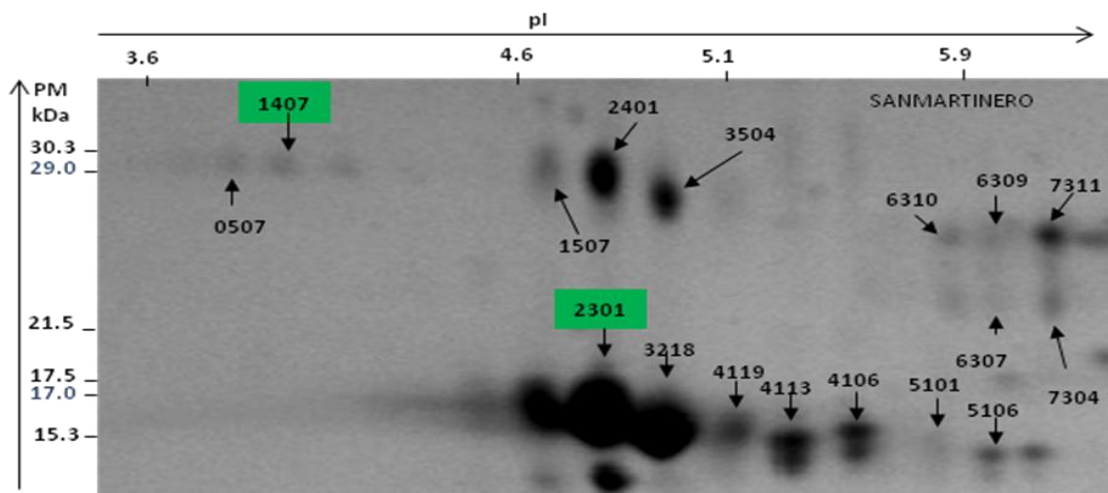


Figura 44. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de viabilidad se señalan en recuadro verde. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imágen del área de visualización de los puntos A1407 y A2301).

VI. 3.1.1.5. Morfología espermática

Análisis del comportamientos entre época de la morfología espermática,

En la Tabla 36 se puede visualizar el análisis de la morfología espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo, en donde el mejor arreglo de covarianzas se obtiene a partir del modelo VCA. Con este modelo se explica que la época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre la morfología espermática ($Pr > F$ 0.2107, 0.1793 y 0.7123, respectivamente) (Tabla 35).

Tabla 35. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la morfología espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	248.7	281.8	247.8
EPOCA	0.2101	0.2101	0.2107
REPETICION	0.2534	0.1481	0.1793
REPETICION*EPOCA	0.7509	0.6767	0.7123

BIC – Criterio de inrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la morfología espermática para la época lluviosa fue de $86.19 \pm 6.67\%$ y para la seca de $82.10 \pm 6.56\%$ (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en la morfología espermática

En la figura 45 se observan las proteínas A507, A2301, A5006, A1407, A2001, A4119 y A4113 seleccionadas por ACP. Estas proteínas al ser sometidas al análisis de regresión polinomial, con el fin de establecer el valor que cada una de estas ejerce sobre la variable respuesta, se visualiza a nivel general, y para cada una de las épocas, que los modelos de regresión polinomial con todas las proteínas seleccionadas no pueden explicar el comportamiento de la morfología espermática (Tabla 36).

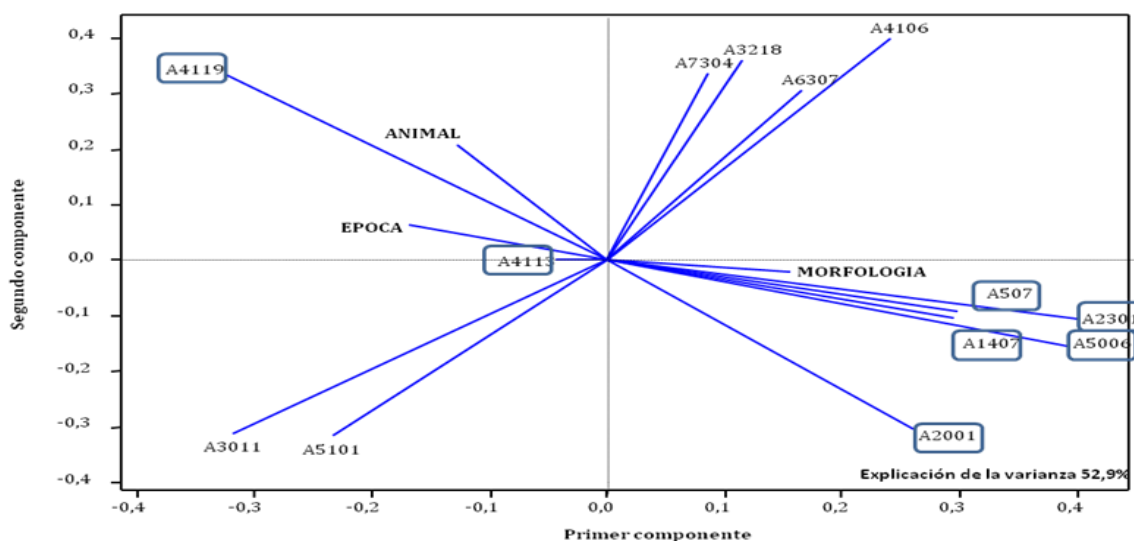


Figura 45. Proteínas que intervienen en la expresión de la morfología espermática a través del análisis de componentes principales.

Tabla 36 Estadísticos para determinar el comportamiento de la morfología espermática mediante las proteínas seleccionadas a través del modelo de regresión polinomial

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.8578	0.5920	0.6738
R ²	0.2186	0.9004	0.7261
R ² ajustado	-0.2787	0.2030	-0.2327

De igual forma, al hacer el análisis mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción de la morfología no se pudieron establecer proteínas asociadas ni a nivel general

ni para la época de lluvias y seca. No obstante, al calcular el coeficiente de correlación parcial entre la concentración de proteínas y la morfología espermática se observa solamente a nivel general para la proteína A4119 una asociación inversa muy débil a pesar de su significancia ($r = -0.35119$ y $Pr > |r| 0.0263$).

VI. 3.1.1.6. Índice de calidad espermática (ICE)

Análisis del comportamientos entre época del ICE

En la Tabla 37 se puede observar el análisis del ICE expresado de la motilidad, viabilidad, morfología y concentración espermática en donde la mejor estructura de covarianzas se obtuvo a partir del modelo VCU el cual expresó el menor BIC (-2.8). Los resultados reflejados en la Tabla explican que la época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre el ICE ($Pr > F 0.2409, 0.6733$ y 0.0562 , respectivamente).

Tabla 37. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre el ICE mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	-22.4	-2.8	-22.4
EPOCA	0.2409	0.2409	0.2376
REPETICION	0.8863	0.6733	0.8900
REPETICION*EPOCA	0.3973	0.0562	0.4090

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios generales obtenidos para el ICE señalan en la época lluviosa valores de 0.54 ± 0.33 y para la seca de $0.49 \pm 0.17\%$ ($p > 0.05$) (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en los cambios del ICE

Seleccionados los puntos de proteína por análisis de componentes principales (ACP) A2301, A1407, A2001, A4119, 6307 y A4113, con una explicación de la variación del 53.7% (figura 46) y seguidamente analizados mediante un modelo de regresión polinomial (Tabla 38), los resultados señalan un nivel de significancia de $P > F 0.0185$ y $R^2 = 0.6704$ para el análisis a nivel general. En cuanto al comportamiento de los puntos de proteínas se observa que la A2301 presenta un comportamiento inverso y las A4113, A4119, A1407, A2001 y A6307 un comportamiento directo con respecto al ICE. Los puntos de proteína que dentro del modelo indican efecto significativo ($P < 0.05$) corresponden a la A4113, A4119, A2001, A6307 (Tabla 38, Figura 47).

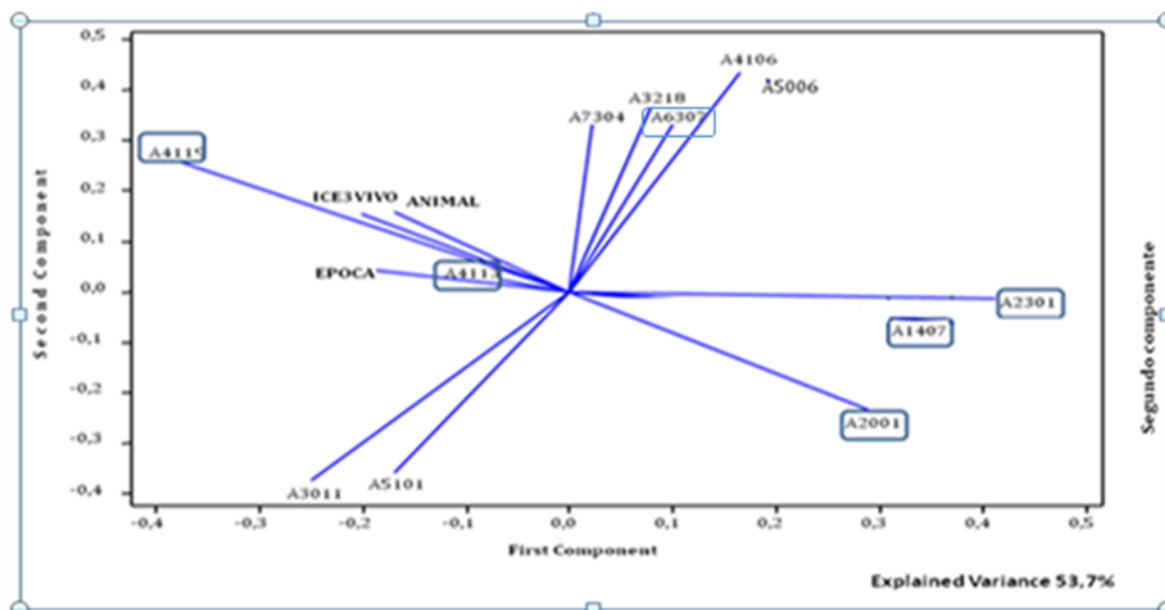


Figura 46. Proteínas que intervienen en la expresión del ICE a través del análisis de componentes principales.

Tabla 38. Estadísticos para determinar el comportamiento del ICE a través de las proteínas seleccionadas por ACP mediante un modelo de regresión polinomial.

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.0185		0.8845		0.0613	
R ²	0.6704		0.6394		0.8911	
R ² ajustado	0.5056		-1.5241		0.7276	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	0.16429	0.1953	0.59288	0.3889	0.07338	0.5848
A4113	0.03311	0.0499	-0.08582	0.7293	0.03486	0.1898
A4119	0.01215	0.0451	0.03704	0.7253	0.01717	0.0545
A2301	-0.00339	0.3002	-0.00947	0.8322	0.0007725	0.9121
A1407	0.01911	0.5815	-0.09214	0.8357	-0.05435	0.5755
A2001	0.0432	0.0022	0.02417	0.8781	0.06561	0.0599
A6307	0.06082	0.0350	0.01177	0.8768	0.04611	0.2889

Al calcular el coeficiente de correlación parcial entre la concentración de proteínas y ICE a nivel general se observa para la proteína A5006 una asociación inversa y significativa ($r = -0.3851$, $p < 0.05$) y directa para la A7304 ($r = 0.3498$, $p < 0.05$); a pesar de su significancia, se aprecian unas asociaciones muy débiles.

Los análisis nos llevan a resaltar la evaluación mediante regresión polinomial en donde involucra los puntos de proteína en forma significativa descritos en la figura 48 bajo el modelo que explica los cambios del ICE con una $Pr > F$ 0.0185. $r = 0.67$.

$$\text{ICE} = 0.1643 + (\mathbf{A4113} * 0.03311) + (\mathbf{A4119} * 0.01215) + (\mathbf{A2001} * 0.0432) + (\mathbf{A6307} * 0.06082) - (\mathbf{A2301} * 0.00339) + (\mathbf{A1407} * 0.01911).$$

$Pr > F$ 0.0185. $r = 0.67$

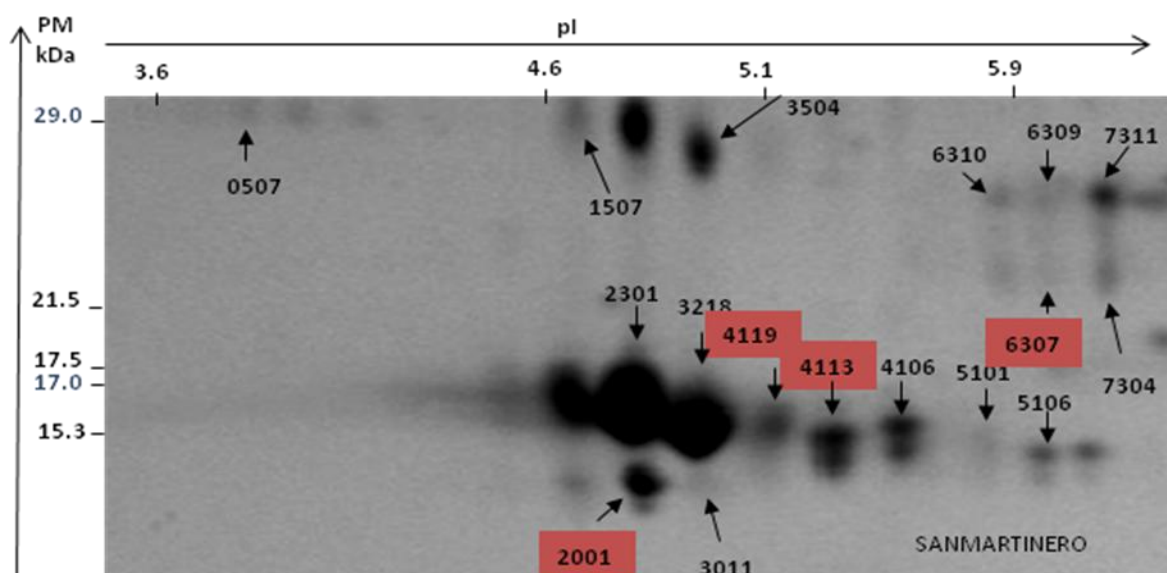


Figura 47. Análisis 2D SDS PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios del ICE se señalan con recuadros. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura.

VI. 3.1.1.7. Producción de espermatozoides congelables (Número de pajillas congeladas)

Análisis del comportamiento entre épocas de la producción de espermatozoides congelables

Para un mejor entendimiento del análisis de resultados de la variable producción de espermatozoides congelables, ésta se expresó como el número de pajillas congeladas a concentraciones de 60×10^6 epz/mL netos después de la corrección y ajuste con los

porcentajes de motilidad, viabilidad y espermatozoides normales de los eyaculados obtenidos de las unidades experimentales.

La evaluación del efecto de la época en el tiempo sobre la producción de espermatozoides congelables se puede observar en la Tabla 39, en donde el arreglo VCA genera su mejor BIC (398.7), indicando que la variable producción de epz congelables representados en pajillas congeladas es afectada por la época ($Pr > F$ 0.0031). Con estos modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo se puede explicar, además, que sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre la variable de estudio ($Pr > F$ 0.4208, 0.8774 respectivamente).

Tabla 39. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre el número de pajillas congeladas mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	CU	VCA
BIC	402,0	434,0	398,7
EPOCA	0,0022	0,0022	0,0031
REPETICION	0,4597	0,3828	0,4208
REPETICION*EPOCA	0,8698	0,9000	0,8774

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios generales de número de pajillas congeladas para la época lluviosa y seca fueron de 166.06 ± 35.54 y $101,1 \pm 57.6$ respectivamente (Tabla 23).

Participación de las proteínas seleccionadas en la producción de espermatozoides congelables

Seleccionados los puntos de proteína A4119 y A4113, A507, A2301, A5006, A1407 y A2001 con una explicación del 54% por análisis de componentes principales (ACP) (figura 48), se procede a analizar estos puntos mediante un modelo de regresión polinomial.

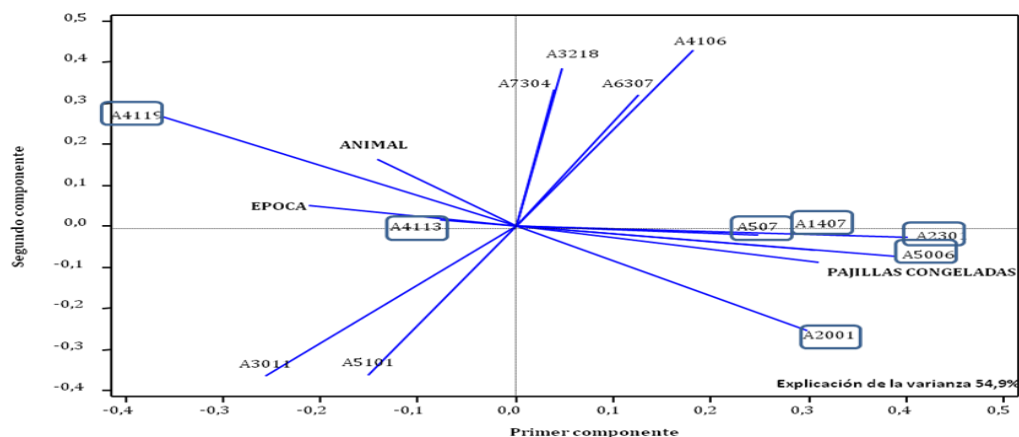


Figura 48. Proteínas que intervienen en la expresión del número de pajillas congeladas a través del análisis de componentes principales.

Los resultados obtenidos a pesar de la diferencia entre épocas, señalan efecto para el nivel general $P > F$ 0,0286, un R^2 de 0,6965. Para cada una de las épocas los modelos de regresión polinomial no pueden explicar el comportamiento del número de pajillas congeladas. A nivel general se observa en forma significativa ($p < 0.05$) explicación de la proteína A1407 (Tabla 40).

Tabla 40. Estadísticos para determinar el comportamiento del número de pajillas congeladas por épocas a través de las proteínas seleccionadas mediante modelos de regresión polinomial.

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.0286		0.6538		0.5460	
R ²	0.6965		0.8728		0.7980	
R ² ajustado	0.5034		-0.0174		0.0911	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	29.86907	0.6372	5.92612	0.9760	-12.01418	0.9290
A507	-19.41705	0.3286	-6.64708	0.8432	45.64036	0.8177
A2301	2.66986	0.0999	-1.72181	0.5737	7.55144	0.5908
A5006	-23.66013	0.3746	27.44136	0.6784	-21.90899	0.8052
A1407	47.05863	0.0475	23.34796	0.4009	-102.8603	0.8022
A2001	14.20466	0.0571	29.00132	0.3324	8.10872	0.8003
A4113	-12.28069	0.1353	67.9771	0.5200	-16.74999	0.5550
A4119	5.02376	0.1164	-3.09474	0.8280	7.3413	0.3984

Del análisis realizado se genera el siguiente modelo:

$$\text{Producción de espermatozoides congelables} = 29.8691 + (\mathbf{A1407*47.0586}) - (A507*194171) + (A2301*2.6699) - (A5006*23.6601) + (A2001*14.20466) - (A4113*12.2807) + (A4119*5.0238)$$

$$Pr > F \ 0.0286 \ R^2 = 0.6965$$

Al hacer el análisis de estas mismas proteínas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción del número de pajillas congeladas, la proteína asociada a nivel general sin considerar la época fue la A1407, al igual que en el análisis de regresión polinomial, pero en este caso su asociación es individual y está validada por un modelo muy débil $Pr > F \ 0.0265$, $R^2=0.2576$ (Tabla 41).

Tabla 41. Estadísticos del procedimiento de STEPWISE de SAS de las proteínas del plasma seminal seleccionadas en el comportamiento de la producción de espermatozoides congelables (representada por el número de pajillas).

	General	Lluvias	Seca			
Pr > F	0.0265	n.e.	n.e.			
R ²	0.2576	n.e.	n.e.			
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	94.12903	0.0004				
A1407	38.57398	0.0265				

Sin embargo, al involucrar todas las proteínas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción del número de pajillas congeladas, el punto de proteína asociada para la época de lluvias fue la A5101, a nivel general, y para la seca no se pudieron establecer proteínas relacionadas (Tabla 42).

Tabla 42. Estadísticos del procedimiento de STEPWISE de SAS de proteínas del plasma seminal seleccionadas por ACP en el comportamiento de la producción de espermatozoides congelables (representada por el número de pajillas).

	General	Lluvias	Seca			
Pr > F	n.e.	0.0410	n.e.			
R ²	n.e.	0.9959	n.e.			
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente			75.34376	0.0488		
A5101			32.05243	0.0410		

$$\text{Producción de espermatozoides congelables} = 75.34376 + (A5101 \cdot 32.052)$$

Por otra parte, al calcular el coeficiente de correlación parcial entre la concentración de proteínas y el número de pajillas congeladas, se observa una asociación positiva y significativa de la proteína A2001 ($r=0.36$, $p<0.05$), A7304 ($r = 0.42$, $p<0.05$) y A6307 ($r=0.41$, $p<0.05$) a nivel general y para la época de lluvias de la proteína A7304 ($r= 0.55$, $p<0.05$).

Los resultados sobre los puntos de proteína que podrían estar explicando el comportamiento de esta variable se registran en el gel en color verde a nivel general sin considerar la época y en color azul para la época lluviosa con una $Pr>F 0.0410$ $R^2=0.99$ (Figura 49).

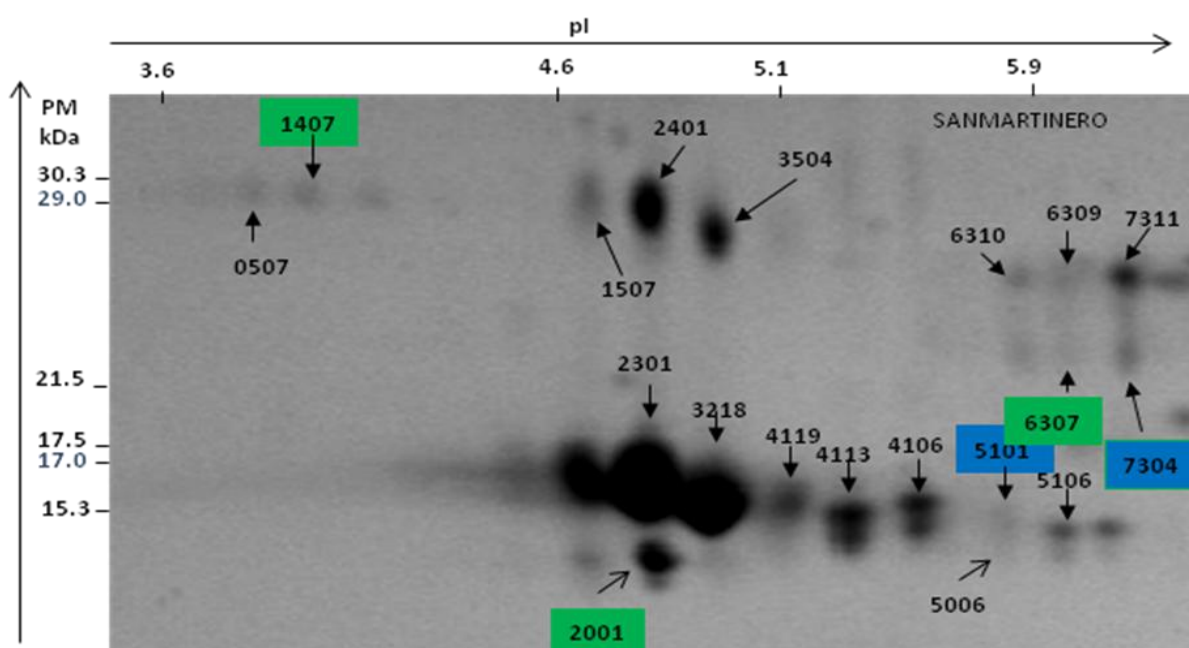


Figura 49. Análisis 2D SDS- PAGE de plasma seminal de ganado de la raza San Martinero. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de producción de espermatozoides congelables por efecto de la época a nivel general se señalan de color verde y en la época lluviosa de color azul. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A1407, A6307, A2001, A5101 y A7304).

VI.3.1.2. Comportamiento de las variables de calidad espermática post-descongelación y su relación con las proteínas del plasma seminal de toros San Martinero en época seca y lluviosa

Para la determinación de la evaluación de la calidad espermática de semen post descongelado se consideraron las variables motilidad, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática (Tabla 43).

Los resultados obtenidos por efecto de la época en la calidad espermática del semen post descongelado señalan un mejor comportamiento de las variables viabilidad, morfología e ICE en términos generales para la época lluviosa que para la época seca, mostrando cambios significativos ($p < 0.05$) para las variables morfología e ICE y altamente significativas ($p < 0.001$) para la variable viabilidad. Por otra parte, al hacer el cálculo de espermatozoides viables por pajilla descongelada se observa que no hay efecto de la época.

Tabla. 43. Efecto de la época lluviosa o seca sobre la calidad espermática post-descongelación de toros San Martinero.

Variable de calidad espermática	n	Época Lluviosa	n	Época Seca	P
Concentración epz/pajilla	35	30×10^6	35	30×10^6	
Motilidad (%)	35	$41.49^a \pm 5.43$	35	$39.14^a \pm 4.79$	0.1952
Viabilidad (%) **	35	$62.77^a \pm 3.12$	35	$58.20^b \pm 4.34$	<0.001
Morfología (% epz normales)*	35	$80.14^a \pm 4.71$	35	$75.43^b \pm 3.66$	0.0019
ICE *	35	$0.21^a \pm 0.09$	35	$0.17^b \pm 0.08$	0.0168
Epz viables /pajilla		$6.26^a \pm 0.43 \times 10^6$		$5.15^a \pm 0.54 \times 10^6$	0.2230

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**). Las pajillas se empacaron a 30×10^6 epz/mL. ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

VI.3.1.2.1. Motilidad espermática post-descongelación

Análisis de los comportamientos entre época de toma de la muestra seminal y la motilidad espermática post-descongelación

En la Tabla 44 podemos observar el análisis de la motilidad espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo en donde se explica que la

época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no presentaron efecto sobre la motilidad espermática post-descongelación ($Pr > F$ 0.1952, 0,6931 y 0.5106, respectivamente).

Tabla 44. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la motilidad espermática post - descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	392.4	411.0	392.1
ÉPOCA	0.1988	0.1988	0.1952
REPETICIÓN	0.6789	0.3583	0.6931
REPETICIÓN*ÉPOCA	0.4959	0.2876	0.5106

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios generales obtenidos de la motilidad espermática post-descongelación para la época lluviosa fueron de $41.49 \pm 5.43\%$ y para la seca de $39.14 \pm 4.79\%$ (Tabla 43).

Participación de las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca en la motilidad espermática post-descongelación

Siguiendo el mismo procedimiento de análisis anterior, se seleccionaron con una explicación del 53% los puntos de proteína A4119, A4113, A507, A2301, A5006, A1407 y A2001 por análisis de componentes principales (ACP), para ser analizadas mediante un modelo de regresión polinomial. Los resultados obtenidos no señalaron, para ninguna de las fuentes de variación efecto sobre el comportamiento de la motilidad espermática post-descongelación (Tabla 45).

Tabla 45. Estadísticos para determinar el comportamiento de la motilidad espermática post-descongelación a través de las proteínas seleccionadas por ACP mediante el modelo de regresión polinomial.

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.4828	0.5895	0.6455
R ²	0.3875	0.9014	0.7436
R ² ajustado	-0.0023	0.2109	-0.1538

Por otra parte, al calcular el coeficiente de correlación parcial a nivel general se determinó que la proteína A507 y la motilidad espermática post-descongelación presentan una asociación positiva y significativa a nivel general de forma débil ($r=0.36$, $p<0.05$)

Finalmente podemos definir que el punto de proteína A507 es el único punto posiblemente relacionado en un nivel muy bajo con la motilidad espermática post-descongelación (Figura 50).

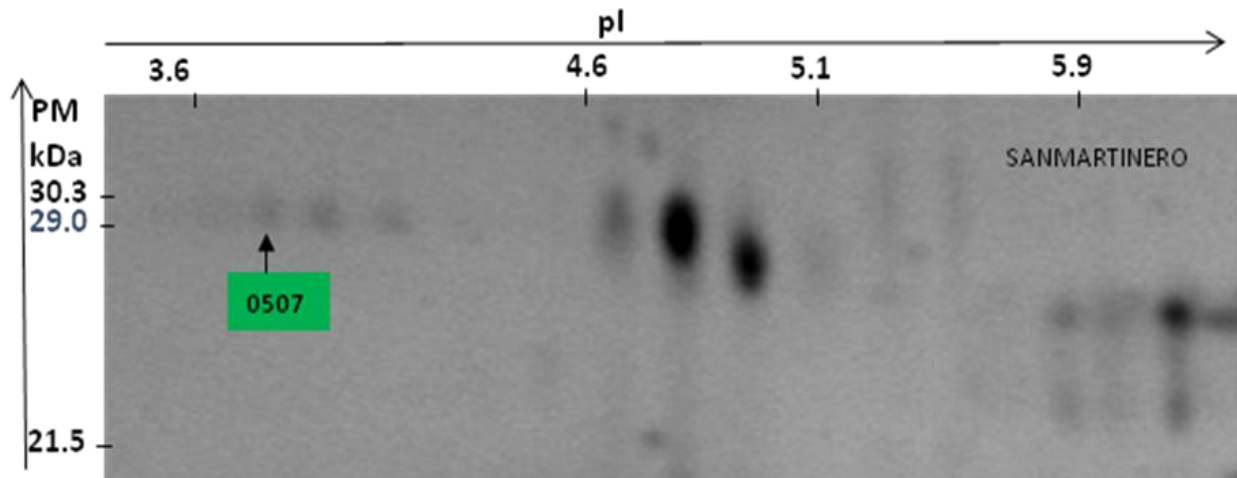


Figura 50. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de motilidad post-descongelación señalados en recuadro verde. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A507).

VI.3.1.2.2. Viabilidad espermática post-descongelación

Análisis de los comportamientos entre época de toma de la muestra seminal y la viabilidad espermática post-descongelación

El análisis de la viabilidad espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió determinar que la época de evaluación presenta efectos sobre la viabilidad, pero sus repeticiones y su interacción no señalan cambio ($Pr > F < .0001$, 0.7713 y 0.5160, respectivamente) (Tabla 46).

El promedio general de la motilidad espermática post-descongelación para la época lluviosa fue de $62.77 \pm 3.12\%$ y para la seca de $58.20 \pm 4.34\%$ (Tabla 43).

Tabla 46. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la viabilidad espermática post-descongelación.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	359.9	381.6	355.6
EPOCA	<.0001	<.0001	<.0001
REPETICION	0.8222	0.7221	0.7713
REPETICION*EPOCA	0.6428	0.4579	0.5160

BIC – Criterio de interlación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Relación de las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca con la viabilidad espermática post-descongelación

Mediante el análisis de componentes principales se seleccionaron los puntos de proteína que posiblemente podrían tener algún efecto sobre la viabilidad espermática post-descongelación y éstos fueron los puntos A4113, A2301, A507, A5006, A1407 y A2001 (explicado desde el ACP en un 53.1%, figura 51). Con estos puntos de proteínas se procedió a realizar un modelo de regresión polinomial para establecer el valor que cada una de éstas ejerce sobre la variable propuesta.

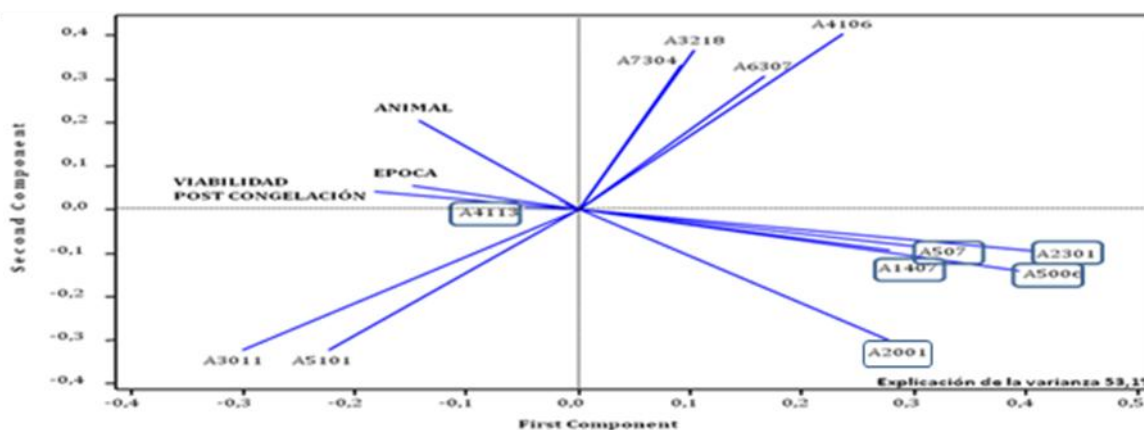


Figura 51. Proteínas que intervienen en la expresión de la viabilidad espermática post-descongelación a través del análisis de componentes principales.

Los resultados señalan que el modelo presenta cambios significativos únicamente para la época seca $P > F$ 0.0449, $R^2 = 0.9508$. En cuanto al efecto de los puntos de proteína, el A507 en la época seca muestra un efecto sobre la viabilidad espermática post-descongelación de forma significativa ($p < 0.05$). A nivel general y para lluvias los modelos de regresión polinomial no pueden explicar el comportamiento de la viabilidad espermática post-descongelación (Tabla 47).

Tabla 47. Estadísticos para determinar el comportamiento de la viabilidad espermática post-descongelación a través de puntos de proteínas seleccionadas mediante el modelo de regresión polinomial.

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.6067		0.8489		0.0449	
R ²	0.2784		0.5327		0.9508	
R ² ajustado	-0.0823		-0.8693		0.8525	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	61.74102	<.0001	69.44179	0.142	59.79654	<.0001
A4113	-0.53924	0.5363	-5.41392	0.6384	1.06742	0.1673
A2301	0.10153	0.5211	-0.00802	0.9831	-0.37339	0.2333
A5006	0.06153	0.9789	-0.62324	0.9515	-4.50296	0.0560
A1407	0.56573	0.8130	-2.35878	0.5200	20.74315	0.0732
A2001	-0.7237	0.3267	-0.91675	0.7918	2.03577	0.0570
A507	-1.48036	0.4964	3.64511	0.4050	-14.29433	0.0292

Al igual que en motilidad, el punto de proteína A507 se asocia con cambios significativos en la viabilidad espermática post-descongelación. Este punto posiblemente podría estar explicando en la época seca estos cambios (figura 52) bajo el modelo de predicción:

$$\text{VIABILIDAD ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN} = 59.80 - (\mathbf{A507} * 14.29) - (A5006 * 4.50) + (A1407 * 20.74) + (A2001 * 2.04) + (A4113 * 1.07) - (A2301 * 0.37)$$

$Pr > F$ 0.0449 $R^2 = 0.95$

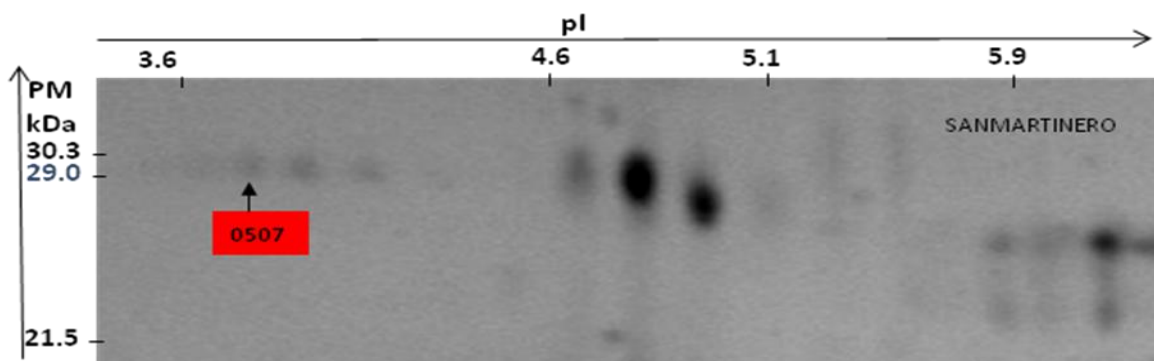


Figura 52 Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de toros de la raza San Martinero. El punto de proteína que posiblemente estaría explicando en forma significativa los cambios de viabilidad espermática post-descongelación en semen colectado en la época seca se señala en recuadro rojo. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A507).

VI.3.1.2.3. Morfología espermática post- descongelación

Análisis de la relación entre la época de toma de la muestra seminal y la morfología espermática post-descongelación

La información de morfología espermática post-descongelación capturada y analizada mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo demostró que la mejor estructura de covarianzas se obtiene a partir del modelo VCA o el VCCS los cuales expresaron similar BIC (372.1). Por su similitud se decidió trabajar con el VCA. El análisis evidencia que la época de evaluación presenta efectos sobre la morfología espermática post-descongelación, mientras que sus repeticiones y su interacción no presentan efecto alguno ($Pr>F$ 0.0019, 0.6558 y 0.5118, respectivamente) (Tabla 48).

Tabla 48. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la morfología espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	372.1	n.d.	372.1
EPOCA	0.0019	n.d.	0.0019
REPETICION	0.6560	n.d.	0.6558
REPETICION*EPOCA	0.5047	n.d.	0.5118

BIC – Criterio de inrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la morfología espermática post-descongelación para la época lluviosa fue de $80.14 \pm 4.71\%$ y para la seca de $75.43 \pm 3.66\%$ (Tabla 43).

Participación de las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca en la morfología espermática post-descongelación

Mediante Análisis de componentes principales (ACP) con una explicación de la variación del 52,7% se seleccionaron los posibles puntos de proteína A507, A1407, A5006, A2301, A2001, A4119 y A4113, que podrían explicar los cambios observados en la morfología espermática post-descongelación (figura 53). Con estas proteínas se procedió a seleccionar aquellas que predijeran mejor la morfología espermática post-descongelación mediante un modelo de regresión polinomial.

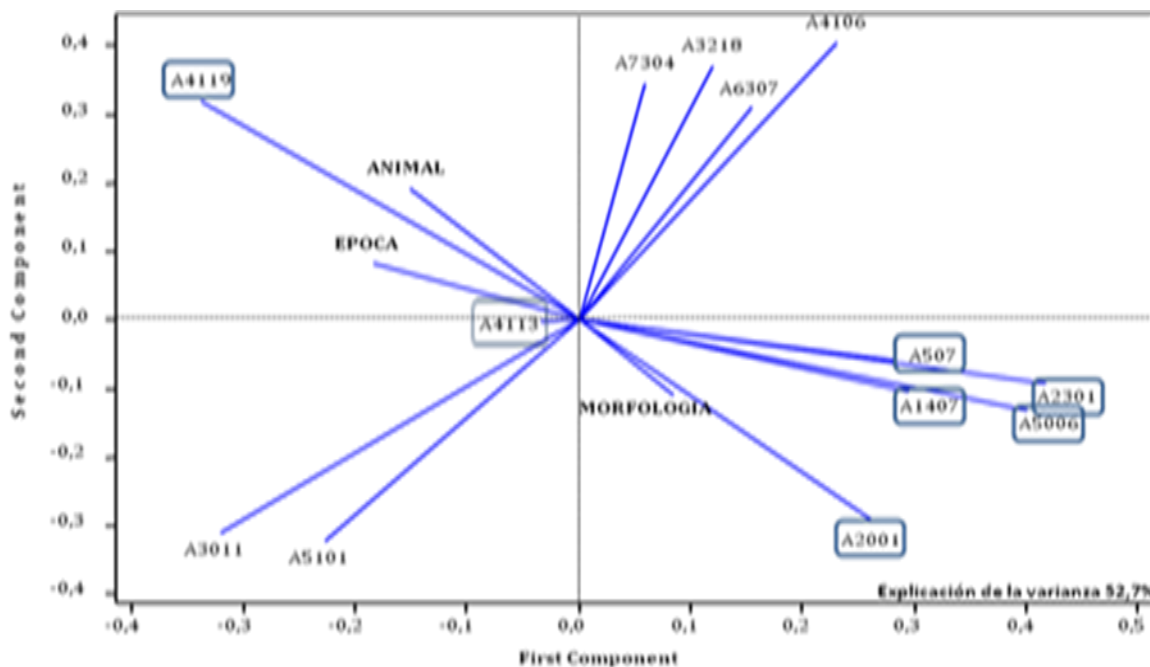


Figura 53. Proteínas que intervienen en la expresión de la morfología espermática post-descongelación a través del análisis de componentes principales.

Los resultados evidencian para la época seca cambios significativos del modelo $P > F$ 0,0204 un R^2 de 0.8034 y un R^2 ajustado de 0.6629. En el modelose resalta a la proteína A4119 que presentó efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el comportamiento de la morfología espermática (Tabla 49).

Tabla 49. Estadísticos para determinar el comportamiento de la morfología espermática post-descongelación a través de las proteínas seleccionadas mediante el modelo de regresión polinomial

	General		Lluvia		Seca	
Pr > F	0.5241		0.7800		0.0204	
R ²	0.1771		0.2565		0.8034	
R ² ajustado	-0.0286		-0.2747		0.6629	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	80.06494	<.0001	77.31473	<.0001	79.33424	<.0001
A4113	0.37298	0.6473	-3.92595	0.4213	0.92807	0.0678
A4119	-0.34409	0.1325	1.71967	0.2651	-0.37235	0.0182
A1407	1.41147	0.5058	-0.94515	0.7147	-3.04736	0.2304
A2001	0.05754	0.9217	0.18367	0.8333	0.74343	0.1621
A507	-0.6375	0.7325	-1.51317	0.6763	-0.7076	0.6946

El modelo que se genera de este análisis se describe como:

$$\text{Morfología espermática post-descongelación} = 79.33 + (A4113*0.93) - (A4119*0.31) - (A1407 *3.05) + (A2001*0.74) - (A507*0.71)$$

Pr>F 0.0204; R² = 0.8034

Al hacer el análisis con todos los puntos de proteína mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para la predicción de la morfología espermática post-descongelación, se estableció que las proteínas asociadas para la época seca involucran la A1407 de forma significativa Pr>F 0.0065; R² = 0.639. A nivel general y para la época de lluvias no se pudo establecer proteínas asociadas (Tabla 50).

Tabla 50. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la morfología espermática post-descongelación por efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General		Lluvias		Seca	
Pr > F	n.e.		n.e.		0.0065	
R ²	n.e.		n.e.		0.6349	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente					83.92406	<.0001
A4119					-0.49137	0.0020
A1407					-3.39749	0.0374

El modelo que se generaría de este análisis se describe como:

$$\text{Morfología espermática post-descongelación} = 83.92 - (A4119*0.491) - (A1407 *3.397)$$

Pr>F 0.0065; R² = 0.639

En la figura 54 se pueden visualizar la posición de los puntos de proteína que posiblemente y en forma significativa tienen que ver con los cambios de morfología espermática post-descongelación en el marco de los dos modelos generados.

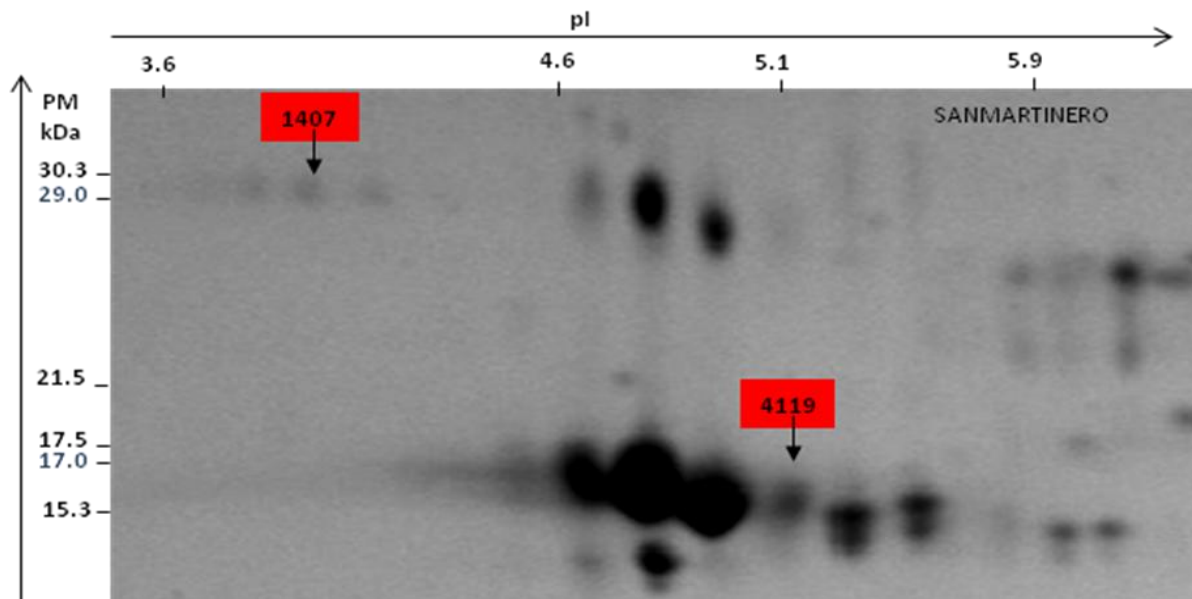


Figura 54. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de morfología espermática post-descongelación del toro San Martinero. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A1407 y A4119). Puntos de proteína capturados de uno de los registros de mejor imagen del estudio.

VI.3.1.2.4. Índice de calidad espermática post-descongelación

Análisis de la relación entre época de toma de la muestra seminal y el índice de calidad espermática (ICE).

En la Tabla 51 se aprecia el análisis del índice de calidad espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo. Se puede deducir que la época de evaluación presentó efecto sobre el índice de calidad, pero no sus repeticiones y su interacción ($Pr>F$ 0.0146, 0.9587 y 0.4566, respectivamente).

Tabla 51. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre el índice de calidad espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	-15.8	8.0	-15.9
EPOCA	0.0146	0.0146	0.0146
REPETICION	0.9549	0.9587	0.9528
REPETICION*EPOCA	0.5118	0.4566	0.5186

BIC – Criterio de inrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios obtenidos del índice de calidad espermática post-descongelación para la época lluviosa fueron de 0.21 ± 0.09 y para la seca de 0.17 ± 0.08 (Tabla 43).

Participación de las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca en el índice de calidad espermática post-descongelación

Las proteínas A4119, A4113, A507, A2301, A5006, A1407 y A2001, seleccionaron con una explicación del 53.6% por el análisis de componentes principales, como las que podrían estar involucradas en el comportamiento del índice de calidad espermática (figura 55). El análisis de estas proteínas mediante modelos de regresión polinomial indicó que tanto a nivel general como para cada una de las épocas, los modelos de regresión polinomial no pueden explicar el comportamiento del índice de calidad espermática post-descongelación (Tabla 52).

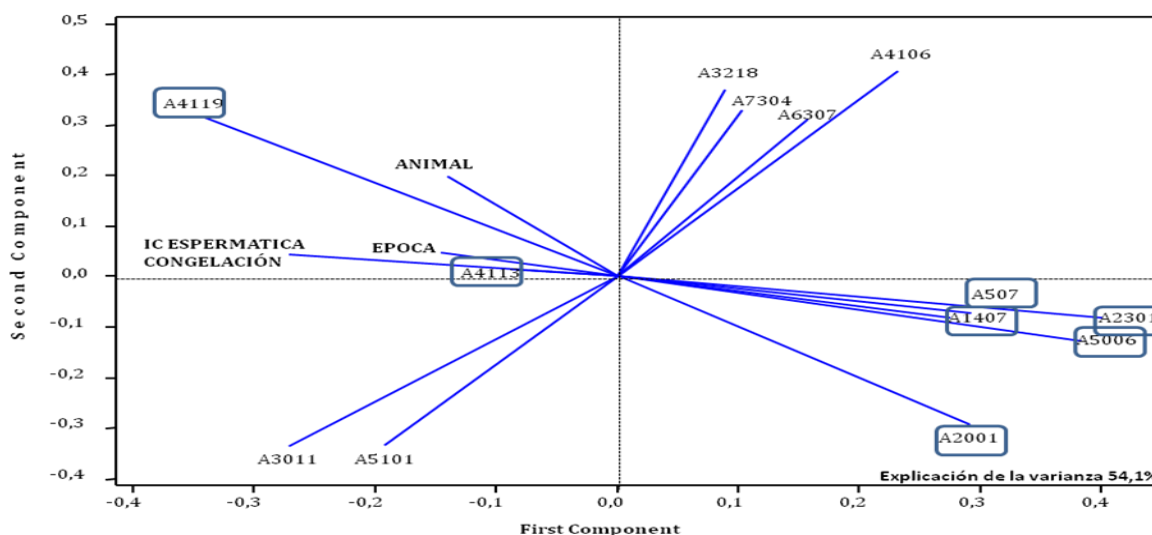


Figura 55. Proteínas que intervienen en la expresión del índice de calidad de calidad espermática post-descongelación a través del análisis de componentes principales.

Tabla 52. Estadísticos para determinar el comportamiento del índice de calidad espermática post-descongelación para las proteínas seleccionadas por ACP a través del modelo de regresión polinomial

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.7108	0.2873	0.6110
R ²	0.2917	0.9794	0.7636
R ² ajustado	-0.1591	0.8354	-0.0639

Sin embargo al realizar el análisis mediante el procedimiento STEPWISE de SAS, los puntos de proteínas asociados con el ICE para la época de lluvia fueron el A7304 y para la seca los puntos A4113 y la A1407 (Tabla 53).

Tabla 53. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del índice de calidad espermática post-descongelación en relación a la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General	Lluvias	Seca
Pr > F	n.e.	0.0357	0.0100
R ²	n.e.	0.9969	0.9535

Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente			0.74104	0.0095	0.55403	0.0001
A7304			-0.05027	0.0357		
A4113					0.02070	0.0247
A1407					-0.10391	0.0084

Del análisis anterior se generan los siguientes modelos:

$$\text{Índice de calidad espermática época de lluvias} = 0.74 - (A7304 * 0.050)$$

$$\text{Pr}>F 0.036 \quad R^2 = 0.997$$

$$\text{Índice de calidad espermática época seca} = 0.55 + (A4113 * 0.021) - (A1407 * 0.104)$$

$$\text{Pr}>F 0.010 \quad R^2 = 0.954$$

En la figura 56 se visualizan los puntos de proteína que explican en forma significativa los posibles cambios del índice de calidad espermática.

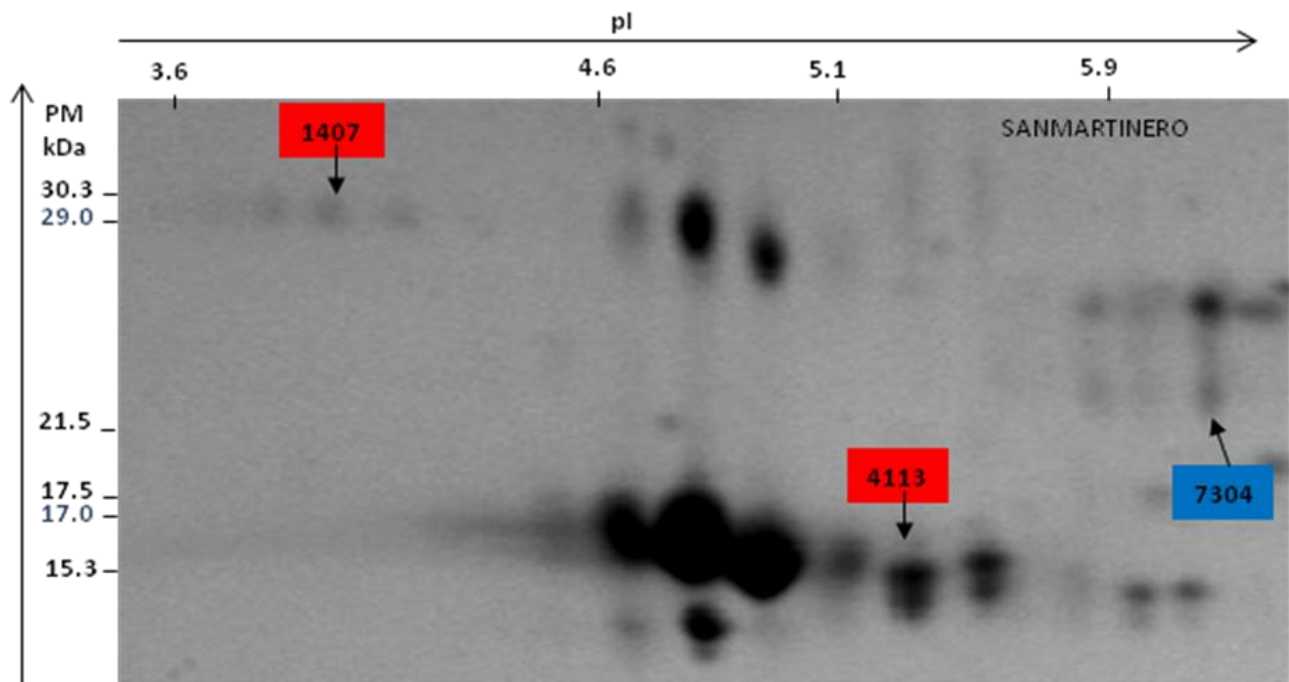


Figura 56. Análisis 2D SDS-PAGE de plasma seminal de ganados de la raza San Martinero, en donde se visualizan los puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios del índice de calidad espermática. En la época de lluvia, se señalan en azul y en la época seca en rojo. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A1407, A4113 y A7304).

VI.3.1.3. Relación entre los resultados fertilidad *in vitro* y las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa

VI.3.1.3.1. Porcentaje de fertilidad *in vitro* (2PN)

Análisis de la relación entre época de toma de la muestra seminal y la fertilidad *in vitro*

El porcentaje de fertilidad (2PN) evaluado mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo a partir del modelo VCA, el cual expresa el mejor BIC (460.9), no resultó afectado por la época de evaluación, sus repeticiones ni su interacción no presentan efecto ($Pr > F$ 0.8620, 0.7735 y 0.8158, respectivamente) (Tabla 54).

Tabla 54. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre la variable 2PN, mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	465.7	483.0	460.9
EPOCA	0.8720	0.8720	0.8620
REPETICION	0.6919	0.7534	0.7735
REPETICION*EPOCA	0.8629	0.8060	0.8158

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Los promedios generales del porcentaje de fertilidad *in vitro* fueron de 65.30 ± 8.95 para la época lluviosa y de 64.83 ± 9.35 para la seca de (Tabla 43).

Relación entre las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca con la fertilidad *in vitro*

Los puntos de proteína seleccionados por ACP con una explicación de la variación del 56.3% y analizados mediante un modelo de regresión polinomial A3011, A5101, A4113, A7304, A3218, A6307 y A4106 (figura 57, Tabla 55), señalaron que a pesar de la no diferencia entre épocas planteada por el modelo mixto con medidas repetidas en el tiempo, se evidencia en este análisis que para la época de lluvias la Pr>F fue de 0.0171, un R² de 0.9999 y un ajustado de 0.9994; indicando un posible efecto sobre la variable 2PN con influencia significativa de los puntos de proteína A4106; A6307; A3218; A5101; A3011; A4113.

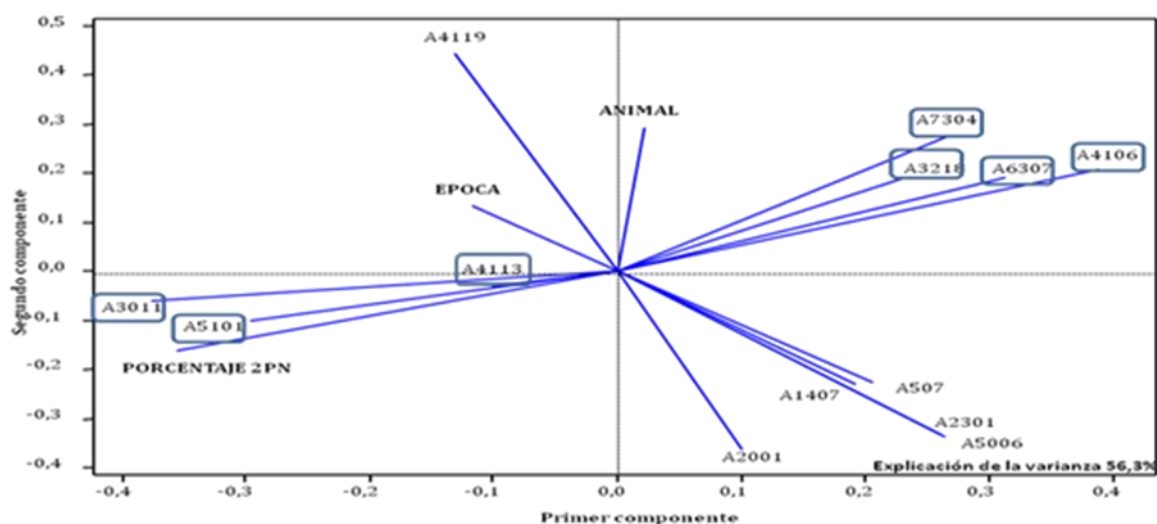


Figura 57. Proteínas que intervienen el porcentaje de fertilidad a través del análisis de componentes principales.

Tabla 55. Estadísticos para determinar el comportamiento de la variable 2PN a través de las proteínas seleccionadas por ACP mediante el modelo de regresión polinomial

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.5990	0.0171	0.8295
R ²	0.3617	0.9999	0.7500
R ² ajustado	-0.0851	0.9994	-1.0001

Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	74.05023	<.0001	122.25862	0.005	69.20924	0.1392
A4106	-2.68138	0.1871	-2.93918	0.0223	-10.88391	0.5551
A6307	3.16433	0.2861	1.46166	0.0476	4.33481	0.7785
A3218	-0.19323	0.6397	-1.84837	0.0086	2.26469	0.4984
A7304	-1.33998	0.3728	-0.09047	0.3068	-2.442	0.7607
A5101	-0.04545	0.9739	-6.03423	0.0161	0.33123	0.9288
A3011	-0.13795	0.9263	9.35571	0.0106	-3.60903	0.6433
A4113	1.35693	0.4291	6.81355	0.0142	-2.98595	0.6282

2PN época lluviosa = 74.05 – (A4106*-2.94) + (A6307*1.462) – (A3218*1.84) – (A5101*6.034) – (A3011*9.36) + (A4113*6.81)- (sin desconocer la participación aunque no significativa en este modelo del punto de proteína A7304* 0.090).

$$Pr>F 0.017 \quad R^2 = 0.99$$

Al realizar el análisis mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para predecir el efecto de las proteínas sobre la fertilidad *in vitro* en función de la época, se evidencio efecto a nivel general. Asi mismo, se encontró que la A7304 incide en forma inversa y significativa (p<0.05), durante la época seca, para la época de lluvias no se evidencio efecto alguno de las proteínas seleccionadas (Tabla 56).

Tabla 56. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la variable 2PN según la concentración de todas proteínas seleccionadas.

	General		Lluvias		Seca	
Pr > F	0.0072		n.e.		0.0123	
R ²	0.6670		n.e.		0.8242	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	76.89504	<.0001			79.64307	<.0001
A7304	-3.09314	0.0072			-3.61376	0.0123

Los resultados infieren que no hay efectos de la época sobre la fertilidad *in vitro*. El punto de proteína A7304 señala cambios significativos a nivel general y en la época seca sobre fertilidad *in vitro* (figura 60), expresado como:

$$\text{Fertilidad a nivel general} = 76.90 - (A7304 \cdot 3.09)$$

$$\text{Pr}>F \ 0.007; R^2 = 0.6670$$

$$\text{Fertilidad época seca} = 76.90 - (A7304 \cdot 3.09)$$

$$\text{Pr}>F \ 0.0123; R^2 = 0.8242$$

En la figura 58 se visualizan los puntos de proteína que explican en forma significativa los posibles cambios de la fertilidad *in vitro* post-descongelación.

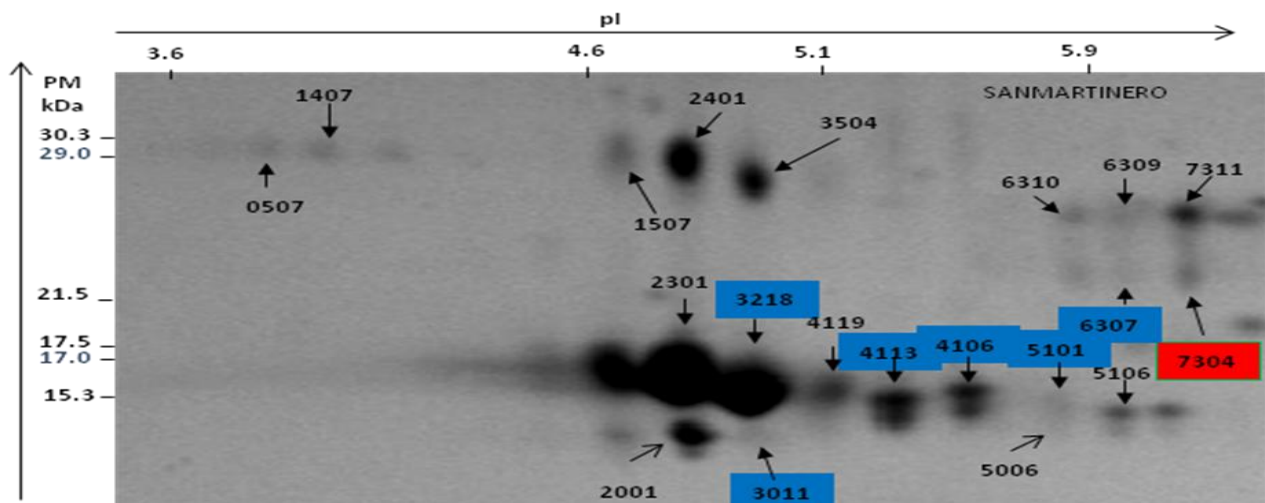


Figura 58. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios de fertilidad espermática *in vitro* post-congelación del toro San Martinero. A nivel general y en época seca se marcan con color rojo y en época lluviosa azul. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A7304, A4106, A6307, A3218, A5101, A3011 y A4113).

VI.3.1.4. Relación entre el porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* y las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época seca y lluviosa

VI.3.1.4.1. Blastocistos

Análisis de la relación entre la época de toma de la muestra seminal y la producción *in vitro* de blastocistos

El análisis del porcentaje de producción *in vitro* de blastocistos mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió a partir del modelo VCA estimar que la época de evaluación, sus repeticiones y su interacción no afectan al comportamiento de esta variable. ($Pr > F$ 0.4542, 0.2384 y 0.9353, respectivamente) (Tabla 57).

Tabla 57. Efecto de la época, repetición y su interacción sobre el porcentaje de blastocistos.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	424.3	427.5	422.3
EPOCA	0.4524	0.4524	0.4542
REPETICION	0.2439	0.2672	0.2384
REPETICION*EPOCA	0.9453	0.8662	0.9353

BIC – Criterio de interrelación bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de porcentaje de blastos para la época lluviosa fue de 32.12 ± 7.75 y para la seca de 29.85 ± 6.66 (Tabla 43).

Participación de las proteínas del plasma seminal de las muestras colectadas en la época lluviosa y seca en la producción de blastocistos

Los puntos de proteína del plasma seminal seleccionados por análisis de componentes principales (ACP) con una definición del 53.2% señalaron a la A4119, A4113, A507, A1407, A2301, A5006 y A2001 como los puntos que podrían estar involucrados en ejercer un efecto sobre el porcentaje de producción de blastocistos (figura 59). En este sentido al analizar estas proteínas mediante un modelo de regresión polinomial se evidencia que a nivel general y para cada una de las épocas, los modelos de regresión polinomial no puede explicar el comportamiento del porcentaje de blastocistos (Figura 59 y Tabla 58).

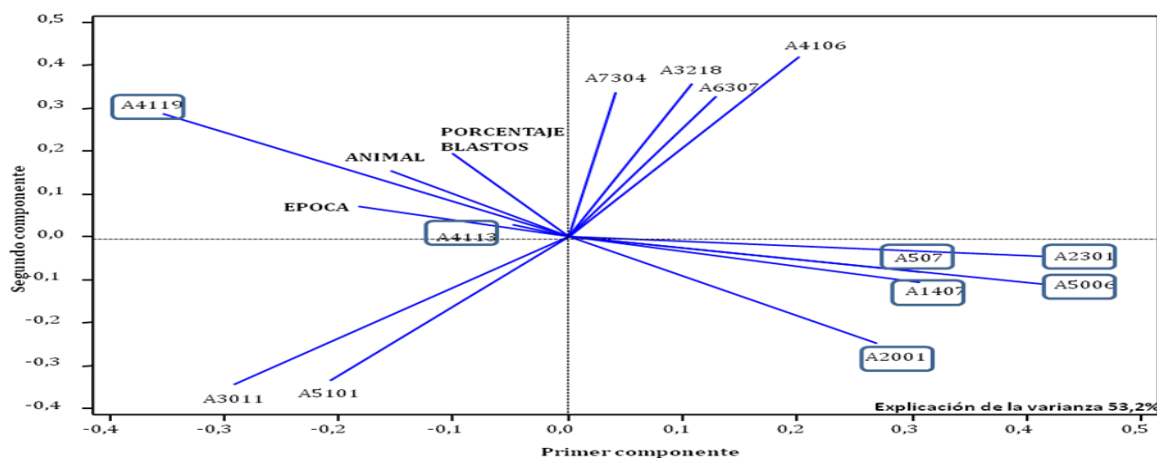


Figura 59. Proteínas que intervienen el porcentaje blastocistos producidos *in vitro* a través del análisis de componentes principales.

Tabla 58. Estadísticos para determinar el comportamiento de la variable porcentaje de blastocistos producidos *in vitro* a través de las proteínas seleccionadas por ACP mediante el modelo de regresión polinomial

	General	Lluvia	Seca
Pr > F	0.5891	0.3953	0.7871
R ²	0.3434	0.9597	0.6427
R ² ajustado	-0.0744	0.6779	-0.6077

Al realizar el análisis involucrando todas las proteínas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS para predecir su efecto en el porcentaje de producción de blastocistos, el punto de proteína A2001 explica los cambios en forma significativa ($p < 0.05$) para la época seca. No se evidenciaron proteínas asociadas a nivel general ni a la época de lluvias (Tabla 59).

Tabla 59. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del porcentaje de blastocistos según la concentración de la proteína A507 en la época lluviosa.

	General		Lluvias		Seca	
Pr > F	n.e.		n.e.		0.0261	
R ²	n.e.		n.e.		0.9983	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente					-5.09234	0.1403
A2001					13.83060	0.0261

El modelo que más se ajusto a este análisis está expresado como.

$$\text{PRODUCCIÓN BLASTOCISTOS} = -5.09 + (\text{A2001} \times 13.83)$$

$$\text{Pr} > \text{F} \ 0.0261 \quad \text{R}^2 = 0.998$$

En la figura 60 se pueden visualizar las posiciones del punto de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios en la producción de blastocistos enmarcada en el modelo

Al hacer el análisis mediante coeficientes de correlación parciales la proteína A4119, ésta presentó un efecto inverso y significativo en la producción de blastocistos a nivel general, pero con un muy bajo nivel de asociación ($r=-0.32$; $p<0.05$) que no amerita ser considerado.

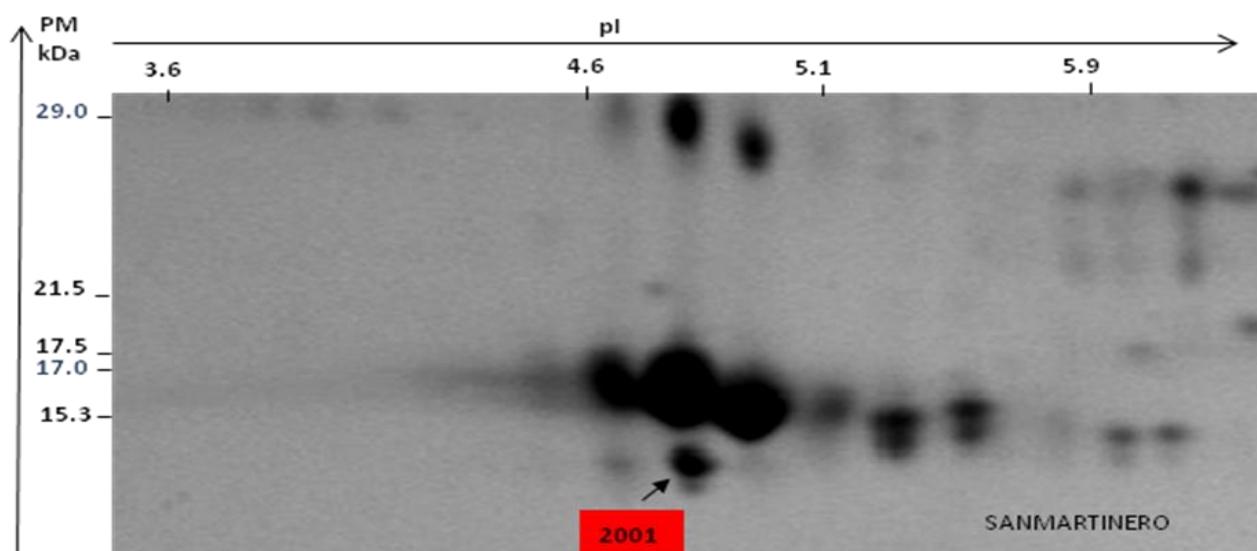


Figura 60. Puntos de proteína que posiblemente estarían explicando en forma significativa los cambios en la producción de blastocistos en la época seca del ganado San Martinero. Las posiciones de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señalan a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A2001). Punto de proteína capturado de uno de los registros de mejor imagen del estudio

VI.3.1.5. Comportamiento de la concentración de puntos de proteínas del plasma seminal en la época lluviosa y seca

En la **Tabla 60** se pueden observar los resultados obtenidos del análisis de los puntos de proteína mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

Los resultados indican que la época de evaluación presenta efecto sobre la concentración de las proteínas A7304, A2301 y A3011 ($Pr>F$ 0.0460, $Pr>F$ 0.0460 y $Pr>F$ 0.0380). Para la

Resultados

repetición o muestreo, la proteína A4119 ($Pr > F$ 0.0050) nos indica su variación de concentración en el muestreo.

Con respecto a la interacción de la repetición y época, observamos efecto para la proteína A5006 ($Pr > F$ 0.0425) y para la proteína A4119 ($Pr > F$ 0.0169), en donde podemos interpretar que los muestreos vistos independientemente se ven afectados por la época (Tabla 50).

Tabla 60: Análisis de modelos mixtos de las proteínas del plasma seminal considerando la época la repetición y la interacción repetición-época.

	A2001			A5101			A5006			A4106			A4113		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	168.9	183.3	168.5	157.0	183.8	153.0	69.5	101.5	66.7	135.6	168.3	134.8	117.6	137.9	115.1
EPOCA	0.152	0.2074	0.181	0.636	0.846	0.483	0.709	0.674	0.642	0.387	0.487	0.560	0.100	0.090	0.118
REPETICION	0.810	0.8838	0.822	0.525	0.694	0.524	0.761	0.722	0.805	0.291	0.081	0.290	0.708	0.709	0.647
RxÉ	0.840	0.964	0.912	0.616	0.495	0.579	0.050	0.069	0.043	0.796	0.268	0.708	0.327	0.207	0.343

	A7304			A6307			A1407			A507		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	149.7	174.8	149.4	90.1	107.6	89.6	76.9	106.7	73.7	100.7	124.8	100.1
EPOCA	0.0489	0.0717	0.0388	0.0942	0.0202	0.065	0.3109	0.2748	0.3038	0.3695	0.3923	0.3451
REPETICION	0.8177	0.75	0.7786	0.8838	0.0002	0.8009	0.4820	0.5921	0.4872	0.6399	0.6369	0.7121
RxÉ	0.5951	0.722	0.665	0.9501	0.1862	0.9176	0.7598	0.7867	0.6085	0.9799	0.9017	0.9779

	A3218			A2301			A3011			A4119		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	249.6	277.0	249.1	265.8	n.e	264.7	113.6	141.6	112.9	209.4	239.4	209.3
EPOCA	0.9703	0.9703	0.9692	0.0048		0.0042	0.0282	0.0030	0.0460	0.1689	0.1491	0.1757
REPETICION	0.2097	0.2138	0.1728	0.2334		0.3072	0.0530	0.0025	0.0741	0.0060	0.0006	0.0050
RxÉ	0.1323	0.1063	0.1651	0.5901		0.6356	0.1860	0.0208	0.3380	0.0218	0.0045	0.0169

BIC – Criterio de inrelación bayesiano, VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry* VCU – *Variance Components, Unstructured* VCA – *Variance Components, Autoregressive*

En la Tabla 61, se puede observar el comportamiento de los valores promedios de la concentración de los puntos de proteínas del plasma seminal en la época lluviosa y seca. Los puntos de proteína A3011, A2301 y A7304 indicaron cambios significativos siendo mayores las proteínas A2301 y A7304 para la época de lluvias y la A3011 para la época seca.

Tabla 61. Promedios de concentración de proteínas del plasma seminal de toros San Martinero en la época lluviosa y seca

Variable	Lluvias		Seca	
	n	Promedio	N	Promedio
A2001	19	3.60 ^a ± 2.23	20	2.29 ^a ± 2.27
A3011	21	1.17 ^b ± 0.71	15	2.95 ^a ± 1.78
A5006	17	1.007 ^a ± 0.70	15	1.006 ^a ± 0.66
A4106	18	2.78 ^a ± 1.18	18	2.97 ^a ± 2.11
A5101	21	2.75 ^a ± 1.72	16	2.62 ^a ± 2.65
A4113	18	1.62 ^a ± 0.82	18	2.23 ^a ± 1.58
A4119	21	6.66 ^a ± 2.80	19	9.70 ^a ± 6.07
A3218	21	17.25 ^a ± 6.28	21	17.16 ^a ± 6.17
A2301	21	19.20 ^a ± 6.91	21	11.84 ^b ± 7.95
A7304	17	4.41 ^a ± 1.98	21	2.74 ^b ± 1.7
A6307	14	2.46 ^a ± 1.02	18	1.82 ^a ± 0.84
A1407	18	1.32 ^a ± 0.82	15	0.96 ^a ± 0.63
A507	19	1.55 ^a ± 0.94	17	1.22 ^a ± 0.88

En la Tabla 62 se puede observar el comportamiento de los promedios de concentración obtenidos en los diferentes puntos de proteína en los muestreos realizados en el tiempo. El punto de proteína A4119 señala cambios significativos por efecto de la repetición.

Tabla 62. Promedios de concentración de proteínas del plasma seminal en cada uno de los muestreos

Variable	1		2		3	
	n	Promedio	N	Promedio	n	Promedio
A2001	12	3.29 ^a ± 3.25	14	2.84 ^a ± 1.40	13	2.69 ^a ± 2.23
A3011	14	1.76 ^a ± 1.56	8	1.06 ^a ± 0.35	14	2.56 ^a ± 1.7
A5006	12	0.95 ^a ± 0.88	11	1.15 ^a ± 0.49	9	0.91 ^a ± 0.6
A4106	13	2.25 ^a ± 1.54	11	3.18 ^a ± 1.55	12	3.28 ^a ± 1.88
A5101	13	2.91 ^a ± 2.93	10	2.56 ^a ± 1.48	14	2.59 ^a ± 1.76
A4113	13	1.65 ^a ± 1.76	11	2.18 ^a ± 1.14	12	2.00 ^a ± 0.69
A4119	14	7.81 ^{ab} ± 5.41	12	5.79 ^b ± 2.86	14	10.39 ^a ± 4.8
A3218	14	15.65 ^a ± 7.12	14	16.78 ^a ± 4.13	14	19.18 ^a ± 6.67
A2301	14	13.86 ^a ± 8.17	14	18.44 ^a ± 6.73	14	14.25 ^a ± 9.41
A7304	10	3.53 ^a ± 2.09	14	3.03 ^a ± 1.39	14	3.65 ^a ± 2.5
A6307	11	1.99 ^a ± 1.32	10	2.15 ^a ± 0.54	11	2.17 ^a ± 0.91
A1407	11	0.95 ^a ± 0.66	10	1.21 ^a ± 0.65	12	1.31 ^a ± 0.91
A507	11	1.35 ^a ± 1.08	12	1.23 ^a ± 0.48	13	1.57 ^a ± 1.12

En la Tabla 63 se pueden observar los puntos de proteína que mostraron alguna interacción entre los muestreos y la época. En este sentido se aprecia cómo el punto de proteína A 5006 y A4119 marcan este efecto.

Tabla 63. Promedios de concentración de proteínas del plasma seminal en cada uno de los muestreos para las dos épocas.

EPOCA	REPETICION	A5006			A4119		
		n	Mean	Std	N	Mean	Std
1	1	7	5.55	3.11 ^{bc}	7	5.55	3.11 ^{bc}
	2	7	6.7	2.20 ^{ab}	7	6.7	2.20 ^{ab}
	3	7	7.75	2.96 ^{ab}	7	7.75	2.96 ^{ab}
2	1	7	10.07	6.49 ^a	7	10.07	6.49 ^a
	2	5	4.51	3.42 ^c	5	4.51	3.42 ^c
	3	7	13.05	4.98 ^a	7	13.05	4.98 ^a

En el análisis de correlación parcial, para establecer los niveles de asociación entre los puntos de proteína (A2001, A3011, A5006, A4106, A5101, A4113, A4119, A3218, A2301, A7304, A6307, A1407 y A507) estudiados (Tabla 64), se evidenciaron relaciones altamente significativas ($p < 0.001$) con coeficientes de correlación mayores al 50% ($r > 0.50$) cuando no es considerada la época como la fuente de variación, para los puntos de proteínas A3011 y A4119; 7304 y A6307; A1407 y A507 respectivamente y con coeficientes de correlación iguales o menores al 50% ($r \leq 50$) en forma significativa ($p < 0.05$) para las proteínas A2001 y A4119; A2001, y A2301; A2001 y A507; A3011 y A5101; A3011 y A2301; A4106 y A6307; A4119 y A3218 y A4119 y A2301.

Tabla 64. Coeficientes de correlación parcial (r), su probabilidad ($Pr > |r|$) y el número de repeticiones (n) de las proteínas en estudio sin considerar la época.

Proteína	Estadísticos	A5101	A4119	A3218	A2301	A6307	A507
A2001	r		-0.3926		0.4877		0.3767
	Pr > r		0.0162		0.0016		0.0281
	N		37		39		34
A3011	r	0.3837	0.5280		-0.4881		
	Pr > r	0.0229	0.0009		0.0025		
	n	35	36		36		
A4106	r					0.5029	
	Pr > r					0.0075	
	n					27	
A4119	r			0.4381	-0.3942	0.1405	
	Pr > r			0.0047	0.0118	0.4590	
	n			40	40	30	
A7304	r					0.6521	
	Pr > r					<.0001	
	n					31	
A1407	r						0.6474
	Pr > r						<.0001
	n						32

Al igual que en la Tabla 64, de las proteínas estudiadas, A2001, A3011, A5006, A4106, A5101, A4113, A4119, A3218, A2301, A7304, A6307, A1407 y A507, en la Tabla 65 se pueden apreciar las proteínas con niveles de asociación significativos ($p < 0.05$) con $r > 0.45$ para la época de lluvias correspondientes a los puntos de proteína A2001 y A3011; A3011 y A1407; A5006 y A3218; A4113 y A4119 y A7304 y A6307 y A1407 y A507 respectivamente.

Tabla 65 Coeficientes de correlación parcial (r), su probabilidad ($Pr > |r|$) y el número de repeticiones (n) de las proteínas en estudio para la época de lluvias.

Proteína	Estadísticos	A3011	A4119	A3218	A6307	A1407	A507
A2001	r $Pr > r $ n	0.4790 0.0380 19					
A3011	r $Pr > r $ n					0.5393 0.0209 18	
A5006	r $Pr > r $ n			0.6598 0.0040 17			
A4113	r $Pr > r $ n		0.5088 0.0311 18				
A7304	r $Pr > r $ n				0.6321 0.0205 13		
A1407	r $Pr > r $ n						0.6160 0.0085 17

Y para la época seca (Tabla 66) se pueden apreciar las proteínas con los niveles de asociación altamente significativos $Pr > |r| < 0.001$ $r > 0.50$ para A2001 y A507; A4119 y A3218 y en forma significativa $Pr > |r| < 0.05$ $r > 0.50$ para A3011 y A5101; A4106 y A6307; A7304 y A6307 y A1407 y A507 y para coeficientes de correlación $r < 0.50$ A2001 y A4119; A2001 y A2301 y A4119 y A2301.

VI.3.2. Estudios por raza

Para efectos del análisis solo se tuvieron en cuenta aquellos puntos cuya frecuencia de presentación en la raza estaba por encima del 70%. (Tabla 67).

Tabla 66. Coeficientes de correlación parcial (r), su probabilidad (Pr > |r|) y el número de repeticiones (n) de las proteínas en estudio para la época seca.

Proteína	Estadísticos	A5101	A4113	A4119	A3218	A2301	A6307	A507
A2001	r Pr > r n			-0.494 0.0372 18		0.4990 0.0251 20		0.7392 0.0007 17
A3011	r Pr > r n	0.6676 0.0091 14						
A4106	r Pr > r n						0.6919 0.0043 15	
A4119	r Pr > r n				0.7173 0.0005 19	-0.4523 0.0518 19		
A7304	r Pr > r n						0.5984 0.0087 18	
A1407	r Pr > r n							0.7169 0.0026 15

Tabla 67. Frecuencias de presentación de los puntos de proteína del plasma seminal del ganado San Martinero y Cebú.

Comparación de razas			Raza San Martinero	Raza Cebú
Punto de proteína	Mr kDa	pl	Frecuencia	Frecuencia
2001	14.02	4.81	19	21
5101	15.3	5.71	21	19
4113	15.37	5.38	19	20
4119	15.46	5.15	21	21
3218	16.24	4.94	21	21
2301	16.74	4.78	21	21
6310	26.1	5.98	19	21
409	28.62	3.74	18	18
1407	28.62	4.02	18	14
507	28.74	3.87	19	18
4704	66.2	5.6	20	14

calidad espermática y producción espermática de buena calidad reflejada en el número de pajillas congeladas a 60×10^6 epz/mL (Tabla 68.).

Tabla 68. Datos de la calidad espermática de las razas San Martinero y Cebú

Variable de calidad espermática	n	Raza San Martinero	n	Raza Cebú Brahman	P
Volumen Seminal (mL) *	21	9.36 ^a ± 1.97	21	6.33 ^b ± 2.17	0.0020
Concentración (epzX10 ⁶)/mL**	21	996.38 ^a ± 122	21	682.57 ^b ± 185	<0.001
Motilidad (%)*	21	82.62 ^a ± 3.75	21	79.19 ^b ± 4.27	0.0293
Viabilidad (%)	21	75.57 ^a ± 4.27	21	74.33 ^a ± 3.92	0.4342
Morfología (% epz normales)	21	86.19 ^a ± 6.67	21	82.05 ^a ± 2.09	0.0762
ICE** (Concent. Motil. Viabil. Morf)	21	0.54 ^a ± 0.33	21	0.33 ^b ± 0.09	<0.001
Epz congelables (N° pajillas) **	21	166.06 ^a ± 35.54	21	71.37 ^b ± 31.59	<0.001
Epz congelables (N° pajillas/mL)**	21	17.9 ^a ± 2.80	21	10.9 ^b ± 3.00	<0.001
Epz congelables/mL **	21	537x10 ^{6a} ± 84 ⁶	21	327x10 ^{6b} ± 90 ⁶	<0.001

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**). Las pajillas para congelación se empacaron a 30×10^6 epz/ML. ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

La calidad espermática del semen fresco de los toros San Martinero es superior a la de los toros Cebú Brahman. Se observan diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) para los promedios de las variables concentración, Índice de calidad espermática, y espermatozoides congelables de todo el volumen seminal y por mililitro, Así mismo se observaron significativas ($p < 0.05$) para las variables volumen seminal y, motilidad y no significativas para las variables viabilidad y morfología espermática). En términos generales, se observa un mejor comportamiento de calidad espermática del semen de los toros de la raza San Martinero.

VI.3.2.1.1. Volumen seminal.

Análisis del comportamiento del volumen seminal entre las razas San Martinero y Cebú

En la Tabla 69 se pueden apreciar los resultados del análisis de comparación del volumen seminal que explican que la raza y sus repeticiones tienen un efecto significativo sobre esta variable ($Pr > F$ 0.0020 y 0.0104, respectivamente), mientras que su interacción no presentó

efecto ($Pr > F$, 0.6174) (Tabla 70). Los promedios de comparación obtenidos a nivel general del volumen seminal para la raza San Martinero fueron de 9.36 ± 1.98 ml, y para el Cebú 6.33 ± 2.17 ml (Tabla 68).

Tabla 69. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre volumen seminal analizado mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	166.4	199.1	166.1
RAZA	0.0022	0.0022	0.0020
REPETICION	0.0061	0.0059	0.0104
REPETICION*RAZA	0.6205	0.5676	0.6174

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El efecto de la repetición ($p < 0.05$) en el volumen seminal Tabla 70, se debe al mayor valor encontrado en el segundo muestreo, que señala cambios significativos con el primero y con la tercera repetición.

Tabla 70. Efecto de la repetición sobre el volumen seminal (en ml).

Repetición	N	Mean	Std
1	14	8.54 ^b	2.28
2	14	8.61^a	2.40
3	14	8.39 ^b	2.68

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$)

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios del volumen seminal por efecto de la raza

Para encontrar la mejor asociación de las proteínas del plasma seminal que explique los cambios del volumen seminal, se realizó en primer lugar un análisis de componentes principales (ACP), el cual permitió seleccionar los puntos de proteína A2301, A3218, A4119, A6310, A507, A409, A1407 y A5101 (Figura 62). Una vez seleccionadas las proteínas, se procedió a analizarlas bajo el procedimiento STEPWISE de SAS, cuyos resultados señalan que la proteína A3218 podría estar relacionada en forma inversa con los cambios en volumen seminal ($Pr > F$ 0.026. $R^2 = 0.44$) para la raza Cebú, mientras que para la raza San Martinero no se encontraron proteínas relacionadas con los valores de volumen seminal. A nivel general se observa en el análisis un efecto inverso de la proteína A4119 sobre el volumen seminal ($Pr > F$ 0.0034) pero con un R^2 ($R^2 = 0.31$) muy débil (Tabla 71).

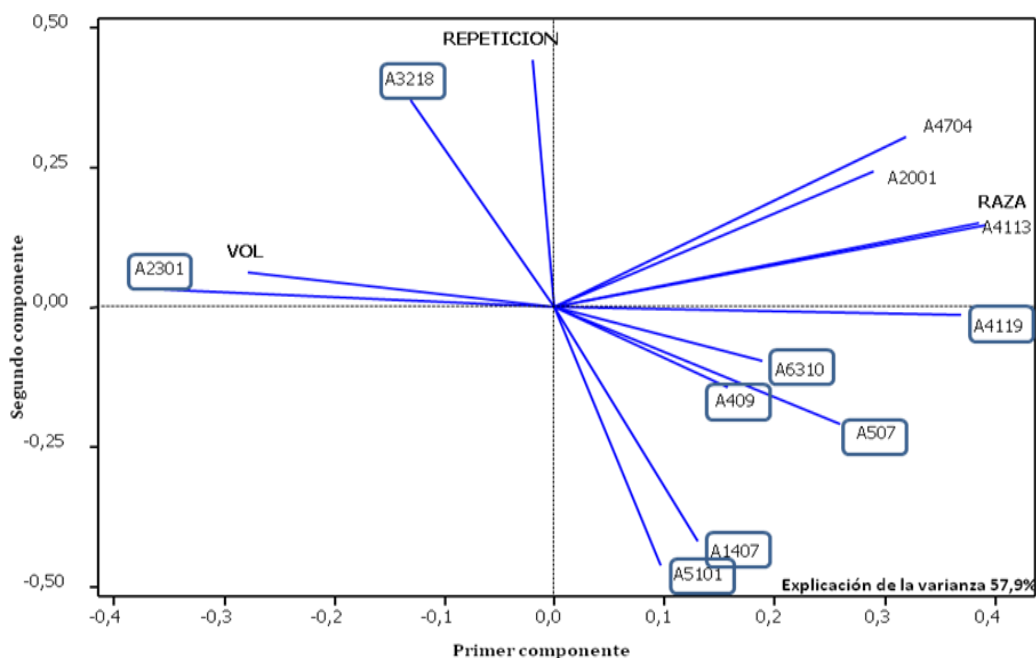


Figura 62. Proteínas que intervienen en la expresión del volumen seminal a través del análisis de componentes principales.

Tabla 71. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del volumen seminal en razón a la concentración de las proteínas seleccionadas por ACP.

	General	Raza San Martinero	Raza Cebú			
Pr > F	0.0034	n.e.	0.0263			
R-cuadrado	0.3053	n.e.	0.4389			
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	10.7378	<.0001			9,2501	<.0001
A4119	-0.2836	0.0034				
A3218					-0,2096	0,0263

Cuando el análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS se realiza no solamente con los puntos de proteína seleccionados por ACP, sino incluyendo los 11 puntos definidos para la comparación entre razas, se observa que el punto de proteína A4704 se relaciona con los cambios de volumen seminal en la raza San Martinero (Pr > F 0.0143). Por otra parte, el análisis a nivel general indica que la proteína A4119 se relaciona en forma inversa con los cambios de volumen seminal (Pr > F 0.0017; R² = 0,49). (Tabla 72).

Tabla 72. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del volumen seminal según la concentración del total de las proteínas en estudio.

	General		SM		Cebú
Pr > F	0.0017		0.0143		n.e.
R-cuadrado	0.4935		0.5048		n.e.
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	
Término independiente	13.6081	<.0001	4.58613	0.0255	n.e.
A4119	-0.53526	0.0017			n.e.
A4704			3.68477	0.0143	n.e.

n.e.: no estimado por el procedimiento

Finalmente, al calcular los coeficientes de correlación parciales entre el volumen seminal y la concentración de las proteínas seleccionadas entre razas, se aprecia que únicamente la proteína A3218 presenta una relación inversa y significativa ($r = -0.5318$; $p < 0.05$) para la raza Cebú. El análisis a nivel general, evidencia que las proteínas A4113 y A4119 presentan una relación inversa y altamente significativa ($r = -0.5746$; $p < 0.001$ y $r = -0.5409$; $p < 0.001$, respectivamente), mientras que la proteína A2301 tiene una relación directa y significativa ($r = 0.4563$; $Pr > r 0,0024$) (Tabla 73).

Tabla 73. Coeficiente de correlación parcial (r) y su probabilidad (Pr > r) de las proteínas respecto al volumen seminal.

Proteína	General		San Martinero				Cebú		
	r	Pr > r	n	R	Pr > r	N	R	Pr > r	N
A4113	-0.5746	0.0002							
A4119	-0.5409	0.0002							
A3218						21	-0.5318	0.0131	21
A2301	0.4563	0.0024							

En la figura 63 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios del volumen seminal.

Las respuestas obtenidas de la participación de las proteínas en el comportamiento del volumen seminal no son bien soportadas por los modelos evaluados:

$$\text{Volumen seminal a nivel general} = 13.6081 - (A4119 \cdot 0.53526)$$

$$Pr > F 0.0017 \quad R^2 0.49$$

$$\text{Volumen seminal para San Martinero} = 13.6081 + (A4704 \cdot 3.68477)$$

$$Pr > F 0.0143 \quad R^2 0.50$$

$$\text{Volumen seminal para Cebú} = 9.2501 - (A3218 \cdot 0.2096)$$

$$Pr > F 0.0263 \quad R^2 0.449$$

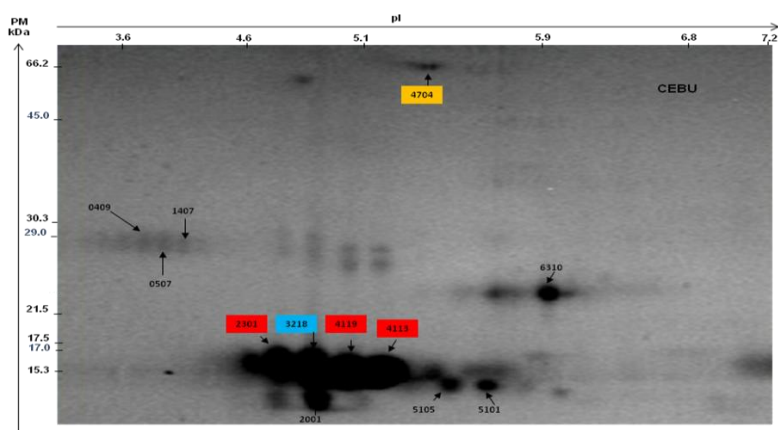


Figura 63. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul, mostaza y rojo, indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento del volumen seminal para la raza Cebú, San Martinero y a nivel General respectivamente en este mapa. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de la posición de los puntos A3218, A4704, A2301, A4119 y A4113). Puntos de proteína capturados de uno de los registros de mejor imagen de uno de los toros cebú.

VI.3.2.1.2. Concentración espermática

Análisis del comportamiento de la concentración espermática entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis que se indica en la Tabla 74 sobre la concentración espermática vista desde los modelos mixtos con medidas repetidas explica cómo la raza, las repeticiones y su interacción afectaron la concentración espermática ($Pr>F <0.0001$; 0.0069 y <0.0001 , respectivamente).

Tabla 74. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la concentración espermática analizado mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	460.0	491.7	458.0
RAZA	<.0001	<.0001	<.0001
REPETICION	0.0096	0.0289	0.0069
REPETICION*RAZA	<.0001	<.0001	<.0001

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la concentración espermática para la raza San Martinero fue de $996.38 \pm 122.18 \times 10^6$ espermatozoides por mL, siendo mayor respecto a la Cebú la cual presentó un promedio de $682.57 \pm 185.29 \times 10^6$ espermatozoides por mL (Tabla 68).

El efecto generado en las repeticiones señaló al primer muestreo, el promedio mayor ($922,43 \times 10^6$), seguido por el 2 y 3 (Tabla 75).

Tabla 75. Efecto de la repetición sobre la concentración espermática (en 10^6 espermatozoides/mL).

Repetición	N	Mean	Std
1	14	922.43 ^a	146.87
2	14	776.36 ^b	322.60
3	14	819.64 ^b	132.53

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0,05$)

El efecto de la interacción Raza X Repetición muestra un cambio diferencial ($p < 0.05$) entre los valores promedios de las repeticiones de la raza San Martinero con respecto a la raza Cebú. El promedio general fue mayor para la raza San Martinero en las repeticiones (Tabla 76)..

Tabla 76. Efecto de la interacción repetición*raza sobre la concentración espermática (en 10^6 espermatozoides).

Raza	Repetición	N	Mean	Std
San Martinero	1	7	1005.57 ^a	142.25
	2	7	1068.57 ^a	104.79
	3	7	915.00 ^a	68.13
Cebú	1	7	839.29 ^b	101.83
	2	7	484.14 ^c	123.54
	3	7	724.29 ^b	110.43

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$)

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios de la concentración espermática

En la Tabla 77 se puede observar el análisis de todas las proteínas definidas para la comparación entre razas mediante un modelo de regresión lineal múltiple para predicción de

la concentración espermática. Los resultados indican que, a pesar de la diferencia altamente significativa entre razas ($p < 0.001$), el modelo explica en conjunto el efecto de las proteínas sobre las variaciones en la concentración espermática; este modelo presenta significancia ($Pr > F 0.0312$), un coeficiente de correlación simple (R-cuadrado) de 0.9287 entre los valores muestrales del volumen seminal respecto a las estimaciones de los valores proporcionados por el modelo y un coeficiente de determinación múltiple (Adj R-Sq) de 0.7717; por otra parte, se observa que las proteínas A4113, 4704 y A5101 tienen $Pr > |t|$ por encima del 95%, por lo que dichas proteínas podrían estar relacionadas en mayor medida con los cambios de la concentración espermática. Por raza no se logran establecer modelos que den explicación a esta variable.

Tabla 77. Estadísticos para el modelo de regresión lineal múltiple del comportamiento de la concentración espermática por efecto de las proteínas del plasma seminal.

	Pr > F	0.0312
	R-cuadrado	0.9287
	Adj R-Sq	0.7717
Variable	Estimado	Pr > t
Término independiente	383.54519	0.4302
A2001	4.75817	0.8740
A5101	87.76486	0.0447
A4113	-55.69465	0.0209
A4119	-11.20065	0.6168
A3218	6.8664	0.4193
A2301	1.55416	0.8501
A6310	-20.66746	0.6841
A409	84.3896	0.3611
A1407	50.91602	0.3854
A507	-35.55593	0.6466
A4704	242.82355	0.0291

El modelo que se generaría de este análisis se describe como:

$$\begin{aligned} \text{Concentración espermática} = & 383.55 + (\mathbf{A5101} * 87.76) - (\mathbf{A4113} * 55.69) + (\mathbf{A4704} * 242.82) - \\ & (A4119 * 11.20) + (A3218 * 6.87) + (A2301 * 1.55) - (A6310 * 20.67) + (A409 * 84.39) + \\ & (A1407 * 50.92) - (A507 * 35.56) \\ & Pr > F 0.0312; R^2 = 0.9287 \end{aligned}$$

Al realizar el análisis de la información con las mismas proteínas mediante el procedimiento STEPWISE de SAS, se observa a nivel general que la proteína A4113 se encuentra relacionada inversamente con los cambios en la concentración espermática ($Pr > F < .0001$); cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas, se encuentra que la proteína

A5101 esta asociada directamente en la raza San Martinero, mientras que en la raza Cebú la proteína A6310 se asocia inversamente y la A4704 lo hace directamente (Tabla 78).

Tabla 78. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la concentración espermática por efecto de las proteínas del plasma seminal.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	<.0001		0.0291		0.0005	
R-cuadrado	0.6869		0.4273		0.9939	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	1048.0549	<.0001	917.30225	<.0001	55.44856	0.2231
A4113	-28.92198	<.0001
A5101	.	.	33.04165	0.0291	.	.
A6310	-37.14653	0.0217
A4704	195.54521	0.0002

Buscando otras alternativas de acción de las proteínas en forma grupal se seleccionaron las proteínas por análisis de componentes principales (ACP), observándose que las posibles proteínas involucradas en el comportamiento de la concentración espermática podrían ser la A4113, A2001 y A4704, con una explicación de la variación del 60.1% (Figura 64).

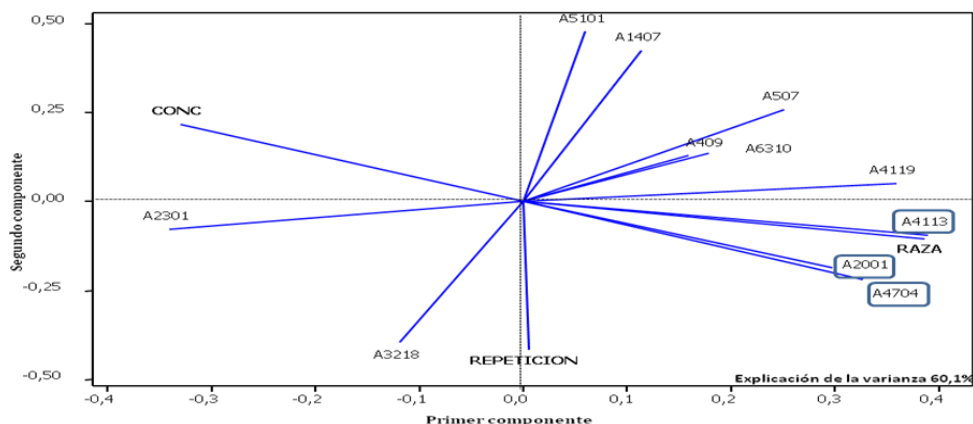


Figura 64. Proteínas que intervienen en la expresión de la concentración espermática a través del análisis de componentes principales.

Al hacer el análisis de la información, mediante el procedimiento STEPWISE de SAS, e involucrando aquellas proteínas seleccionadas mediante el ACP, solamente el modelo general puede ser calculado ($Pr > 0.001$ $R^2 = 0.53$) y asocia a la proteína A4113 con la concentración espermática en forma inversa y altamente significativa $Pr > F$ 0.001, Por raza estos modelos no pueden determinar el comportamiento de la concentración (Tabla 79).

Tabla 79. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la concentración espermática en relación a proteínas del plasma seminal seleccionadas por ACP.

	General	SM	Cebú
Pr > F	<.0001	n.e.	n.e.
R-cuadrado	0.5336	n.e.	n.e.
Variable	Estimado	Pr > t 	Estimado
Término independiente	991.3848	<.0001	
A4113	-23.4777	<.0001	

Al calcular los coeficientes de correlación parciales, no se observan asociaciones entre proteínas que expliquen las variaciones en las razas, pero sí a nivel general. El punto de de proteínas A4113 presenta una relación inversa y altamente significativa ($p < 0.001$), mientras que el punto A4704 presenta una relación directa y altamente significativa ($p < 0.05$) (Tabla 80).

Tabla 80. Coeficiente de correlación parcial (r) y su probabilidad (Pr > |r|) de las proteínas respecto a la concentración espermática.

Proteína	General			San Martinero			Cebú		
	R	Pr > r	N	R	Pr > r	n	R	Pr > r	N
A4113	-0.6923	<.0001	38						
A4704	0.4707	0.0050	34						

En la figura 65 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la concentración espermática.

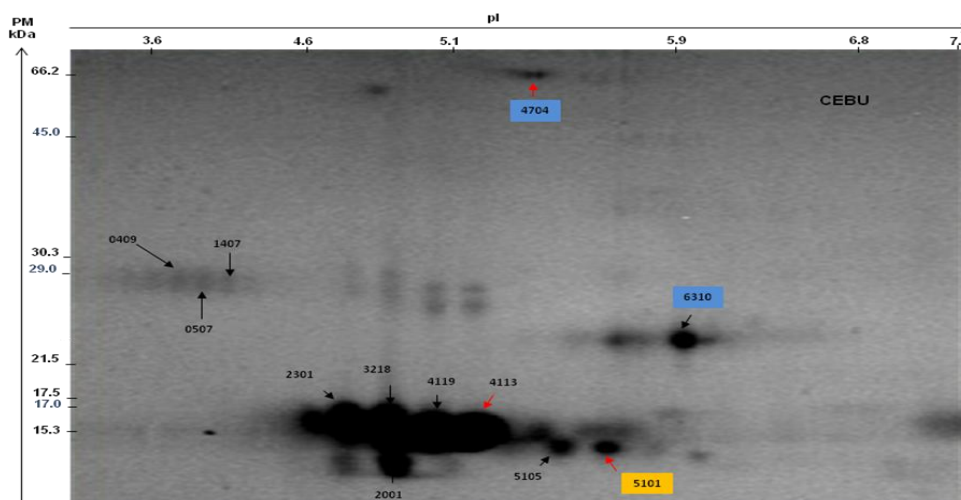


Figura 65. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul, mostaza y rojo, indican los

puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la concentración espermática para la raza Cebú, San Martinero y a nivel general. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4704, A6310, A4113 y A5101 de uno de los registros de un toro Cebú.

VI.3.2.1.3. Motilidad espermática

Análisis del comportamiento de la motilidad espermática entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la motilidad espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió determinar a partir del modelo VCA que la raza afectó la motilidad ($Pr > F$ 0.0293), mientras que la repetición y su interacción no presentaron efecto ($Pr > F$ 0,7637 y 0.4207, respectivamente) (Tabla 81). Los promedios generales de la motilidad espermática para la raza San Martinero fueron de $82.62 \pm 3.75\%$ y para la raza Cebú $79.19 \pm 4.27\%$ (Tabla 68).

Tabla 81. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la motilidad espermática.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	223.6	253.7	220.7
RAZA	0.0252	0.0252	0.0293
REPETICION	0.7802	0.6043	0.7637
REPETICION*RAZA	0.4547	0.4758	0.4207

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios de la motilidad espermática

Determinado el modelo, se efectuó el análisis mediante regresión lineal múltiple para la predicción de la motilidad espermática. Se encontró que el modelo no explica en conjunto el efecto de las proteínas sobre las variaciones en la motilidad; este modelo presenta significancia de ($Pr > F$ 0.0785), un coeficiente de correlación simple (R-cuadrado) de 0.8915 entre los valores muestrales de la motilidad espermática respecto a las estimaciones de los valores proporcionados por el modelo y un coeficiente de determinación múltiple (Adj R-Sq) de 0.6529; en este sentido se observa que las proteínas A2301, A1407 y A4113 podrían estar relacionadas con los cambios de la motilidad espermática dada su significancia ($Pr |t| < ,05$) aunque proteínas como la A409 y A2001 presentan valores muy cercanos al 95% de $Pr |t|$

(Tabla 82); por raza, no se logra, establecer modelos que den explicación a la concentración espermática.

Tabla 82. Estadísticos para el modelo de predicción lineal múltiple del comportamiento de la motilidad espermática de acuerdo a las concentraciones de las proteínas del plasma seminal.

Pr > F		0.0785
R-cuadrado		0.8915
Adj R-Sq		0.6529
Variable	Estimado	Pr > t
Término independiente	100.05483	0.0002
A2001	1.49171	0.0669
A5101	1.68865	0.0710
A4113	-1.23908	0.0215
A4119	-0.32721	0.5181
A3218	-0.07171	0.6989
A2301	-0.73714	0.0084
A6310	-1.31842	0.2741
A409	4.52923	0.0612
A1407	-4.02766	0.0202
A507	-2.12899	0.2496
A4704	1.85072	0.3503

El modelo que se generaría de este análisis se describe como:

$$\text{Motilidad espermática a nivel general} = 100.1 + (A2001 \times 1.49) + (A5101 \times 1.69) - (A4113 \times 1.24) - (A4119 \times 0.33) - (A3218 \times 0.07) - (A2301 \times 0.74) - (A6310 \times 1.32) + (A409 \times 4.53) - (A1407 \times 4.03) - (A507 \times 2.13) + (A4704 \times 1.85).$$

Pr>F 0.0785 R²=0.8915

El análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS a nivel general o para la raza San Martinero no se encuentran proteínas que expliquen el comportamiento de la motilidad, pero cuando se realiza el procedimiento para la raza Cebú se evidencian las proteínas A5101, A4119, A409 y A1407 que podrían estar asociadas a estos cambios (Pr > F 0.0024) (Tabla 83).

Tabla 83. Estadísticos del procedimiento STEPWISE del comportamiento de la motilidad espermática por efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General	SM	Cebú			
Pr > F	n.e.	n.e.	0.0024			
R-cuadrado	n.e.	n.e.	1.0000			
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	82.07255	0.0020
A5101	-0.75605	0.0178
A4119	0.87218	0.0086
A409	1.72711	0.0080
A1407	-8.64717	0.0020

n.e.: no estimado por el procedimiento

El modelo que se generaría de este análisis se describe como:

$$\text{Motilidad Espermática Cebú} = 82.07 - (A5101 \cdot 0.76) + (A4119 \cdot 0.87) + (A409 \cdot 1.73) - (A1407 \cdot 8.65) \text{ Pr}>F = .0024 \text{ R}^2 = 1.00$$

En la figura 66 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la motilidad espermática

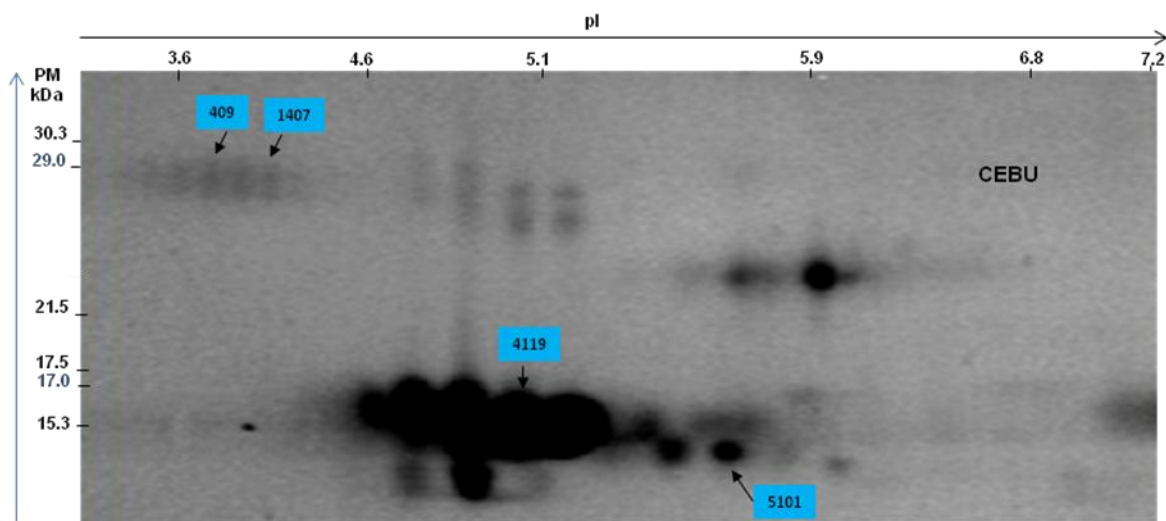


Figura 66. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la motilidad espermática en fresco del toro Cebú se indican en recuadros de color azul. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A409, A1407, A4119 y A5101).

VI.3.2.1.4. Viabilidad espermática

Análisis del comportamiento de viabilidad espermática entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la viabilidad espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió determinar que la mejor estructura de covarianzas se obtiene a partir del modelo VCA el cual expresa el menor BIC (220,7). Los valores obtenidos evidencian que la raza, sus repeticiones y su interacción no afectaron la viabilidad espermática ($Pr > F$ 0.4342, 0.1372 y 0.4178, respectivamente) (Tabla 84).

Tabla 84. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la viabilidad espermática.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	220.8	254.7	220.7
RAZA	0.4353	0.4353	0.4342
REPETICION	0.1333	0.1423	0.1372
REPETICION*RAZA	0.4254	0.4145	0.4178

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*.

El valor promedio de la viabilidad espermática para la raza San Martinero ($75.57 \pm 4.27\%$) es similar a la Cebú ($74.33 \pm 3.92\%$) (Tabla 68).

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios de la viabilidad espermática

Determinado el modelo, se realizó el análisis mediante regresión lineal múltiple, para establecer el conjunto de proteínas que posiblemente presentan efectos sobre la viabilidad espermática. Se encontró que el modelo explica en conjunto el efecto de las proteínas sobre las variaciones de viabilidad ($Pr > F$ 0.0317), con un coeficiente de correlación simple (R-cuadrado) de 0.9281, y un coeficiente de determinación múltiple (Adj R-Sq) de 0.7700. Se observa que las proteínas A6310, A4113 y A2301 podrían estar relacionadas con los cambios de la viabilidad espermática (Tabla 85); mientras que por raza no se logran establecer modelos que den explicación a la viabilidad espermática.

Tabla 85. Estadísticos para el modelo de predicción lineal múltiple del comportamiento de la viabilidad espermática de acuerdo a las concentraciones de proteínas.

General		
Pr > F		0.0317
R-cuadrado		0.9281
Adj R-Sq		0.7700
Variable	Estimado	Pr > t
Término independiente	82.32228	<.0001
A2001	-0.31732	0.4834
A5101	0.60984	0.2638
A4113	-0.78821	0.0240
A4119	0.73999	0.0620
A3218	0.02727	0.8217
A2301	-0.35451	0.0273
A6310	-2.93942	0.0087
A409	0.86684	0.5140
A1407	0.61851	0.4678
A507	-2.22399	0.0928
A4704	2.69263	0.0712

Del análisis realizado se genera el siguiente modelo:

$$\text{Viabilidad} = 82.32 - (A2001 * 0.32) + (A5101 * 0.61) - (A4113 * 0.79) + (A4119 * 0.74) + (A3218 * 0.03) - (A2301 * 0.35) - (A6310 * 2.94) + (A409 * 0.87) + (A1407 * 0.62) - (A507 * 2.22) + (A4704 * 2.69)$$

$$\text{Pr} > F \ 0.0317 \ R^2 = 0.9281$$

Al realizar el análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS a nivel general, se observa que las proteínas A4113, A2301 y A6310 se encuentran relacionadas inversamente con los cambios en la viabilidad espermática (Pr > F 0.0008, R-cuadrado 0.7099); cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas se encuentra la proteína A4119 relacionada directamente con la viabilidad espermática en la raza San Martinero (Pr > F 0,0385), mientras que en la raza Cebú la proteína A2001 esta asociada inversamente a estos cambios (Pr > F 0.0332) (Tabla 86).

Tabla 86. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la viabilidad espermática según la concentración de las proteínas.

	General		San Martinero		Cebú	
Pr > F	0.0008		0.0385		0.0332	
R-cuadrado	0.7099		0.3945		0.7177	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	93.1025	<.0001	68.03933	<.0001	86.00769	<.0001
A4113	-0.31862	0.0260
A2301	-0.44645	0.0027
A6310	-3.17847	0.0003
A4119			1.10969	0.0385		
A2001					-1.88634	0.0332

De este análisis se genera el siguiente modelo:

$$\text{Viabilidad a nivel general} = 93.10 - (A4113 \cdot 0.79) - (A2301 \cdot 0.35) - (A6310 \cdot 2.94)$$

Pr > F 0.0008 R² = 0.70099

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre la viabilidad espermática y la concentración de las proteínas a nivel general no se observan proteínas asociadas, al igual que en la raza Cebú, mientras que para la San Martinero se asocia la proteína A4119 de forma directa y significativa (r=0.51; p<0.05)

En la figura 67 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de viabilidad espermática.

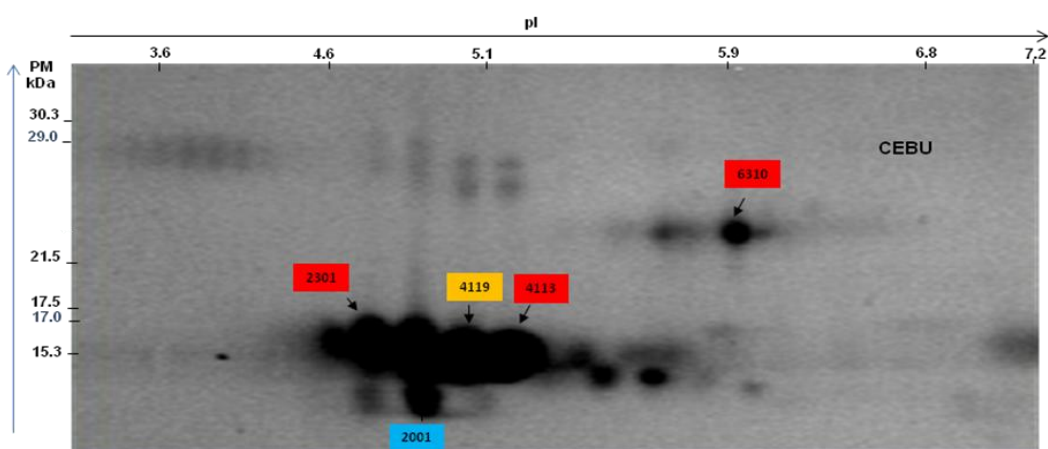


Figura 67. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul, mostaza y rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la viabilidad

espermática para la raza Cebú, San Martinero y a nivel general, respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoelectricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imágen del área de visualización de los puntos A6310, A2301, A4113, A3218, A2001 y A4119).

VI.3.2.1.5. Morfología espermática

Análisis del comportamiento de la morfología espermática entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la morfología espermática visualizado en la Tabla 87 explica que la raza, su repeticiones e interacción no afectan la morfología espermática ($Pr > F$ 0.0762; 0.2033 y 0.1406 respectivamente). Los promedios generales para esta variable fueron de $86.19 \pm 6.67\%$ para el San Martinero y $82.05 \pm 2.09\%$ para el Cebú (Tabla 68).

Tabla 87. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la morfología espermática mediante modelos mixtos con medidas repetidas.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	230.4	257.9	223.9
RAZA	0.0811	0.0811	0.0762
REPETICION	0.3799	0.225	0.2033
REPETICION*RAZA	0.2527	0.1433	0.1406

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios de la morfología espermática

El análisis inicial mediante modelo de regresión lineal múltiple para la predicción de las proteínas que pudieran definir los cambios en morfología espermática no permitió identificar proteínas cuya asociación explicara en forma significativa estos cambios; en este sentido y para efectos de ubicar grupos de proteínas que posiblemente nos pudieran dar información, se realizó una selección mediante el análisis de componentes principales (ACP) y se observó que las posibles proteínas involucradas en el comportamiento de la morfología serían la A3218, A6310, A409, A507, A1407 y A5101, con una explicación de la variación del 57.1% (Figura 68). Al someter estas proteínas al análisis mediante el procedimiento STEPWISE de SAS, se observa a nivel general que la proteína A4119 se encuentra relacionada inversamente con los cambios en la morfología en forma altamente significativa pero con un $R^2 = 0.25$ ($Pr > F$ 0.0069) (Tabla 88).

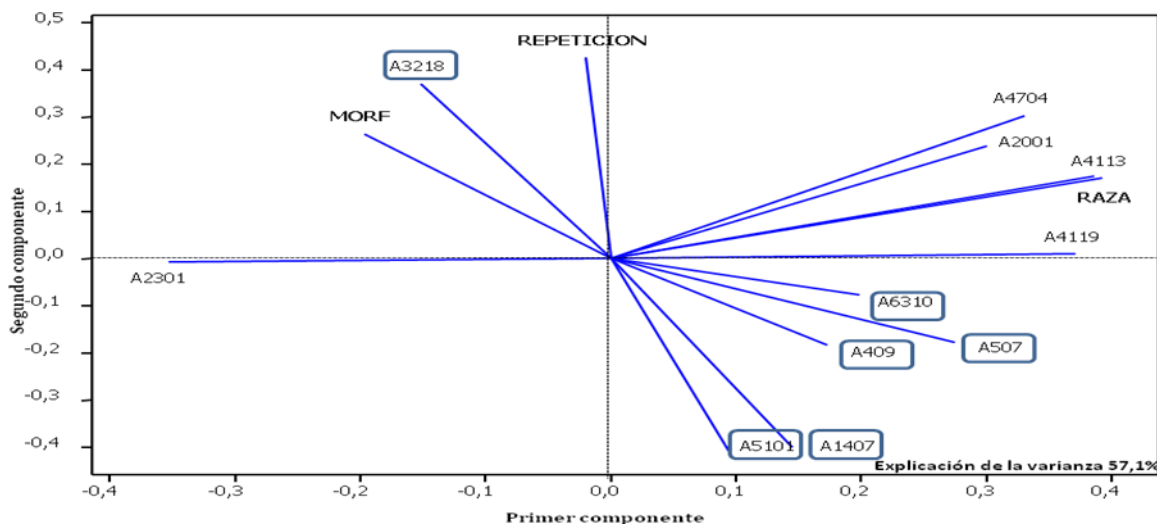


Figura 68. Proteínas que intervienen en la expresión de la morfología espermática a través del análisis de componentes principales.

Tabla 88. Estadísticos del modelo de predicción STEPWISE de SAS del comportamiento de la morfología espermática por efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas por ACP.

GENERAL		
Pr > F	0.0069	
R-cuadrado	0.2490	
Variable	Estimado	Pr > t
Término independiente	89.8849	<.0001
A4119	-0.5430	0.0069

Por otra parte, al calcular los coeficientes de correlación parciales entre la morfología espermática y la concentración de las proteínas seleccionadas, a nivel general se observa que las proteínas A4119 y A4113 presentan una relación inversa y significativa pero con un coeficiente muy débil (Tabla 89).

Tabla 89. Coeficiente de correlación parcial (r) y su probabilidad (Pr > |r|) de las proteínas respecto a la morfología espermática.

Proteína	General		
	r	Pr > r	N
A4113	-0.3228	0.0481	38
A4119	-0.3491	0.0234	42

En la figura 69 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la morfología espermática

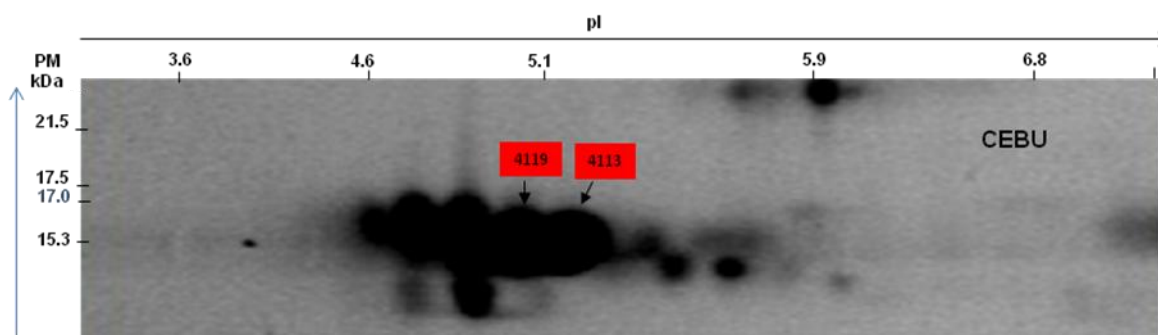


Figura 69. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la morfología espermática a nivel general. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos, se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4119 y A4113).

VI.3.2.1.6. Índice de calidad espermática

Análisis del comportamiento del índice de calidad espermática entre las razas San Martinero y Cebú

El índice de calidad espermática integra los indicadores de concentración espermática, motilidad, viabilidad y morfología. Al ser analizados mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo a partir del modelo VCU se explica que la raza y la interacción afectan el índice de calidad espermática ($Pr>F <.0001$ y 0.0150 , respectivamente), mientras que sus repeticiones no presentaron efecto ($Pr>F, 0.0978$) (Tabla 90).

Tabla 90. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre índice de calidad espermática.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	-69.8	-41.9	-73.6
RAZA	<.0001	<.0001	<.0001
REPETICION	0.0588	0.0978	0.0459
REPETICION*RAZA	0.0023	0.0150	0.0077

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general del índice de calidad espermática para la raza San Martinero fue de, 0.54 ± 0.33 , siendo mayor respecto a la Cebú la cual presentó un promedio de 0.33 ± 0.09 (Tabla 68).

En cuanto a las repeticiones el promedio general fue mayor para la raza San Martinero en forma altamente significativa ($p < 0.001$), seguido de la repetición 1, 3 y 2 de la raza Cebú (Tabla 91).

Tabla 91. Efecto de la interacción repeticion*raza sobre el índice de calidad espermática.

Raza	Repetición	N	Mean	Std
San Martinero	1	7	0.53 ^a	0.09
	2	7	0.56 ^a	0.08
	3	7	0.53 ^a	0.06
Cebú	1	7	0.40 ^b	0.07
	2	7	0.24 ^c	0.06
	3	7	0.34 ^b	0.06

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$)

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios del índice de calidad espermática

En la Tabla 92 se pueden observar los resultados del análisis mediante un modelo de regresión lineal múltiple de las posibles proteínas que participan en el comportamiento del índice de calidad espermática. Los resultados señalan que el modelo explica en conjunto el efecto de las proteínas sobre las variaciones en el índice de calidad espermática con una significancia ($Pr > F 0.0427$), un coeficiente de correlación simple ($R^2 = 0.9180$) entre los valores muestrales del índice de calidad espermática respecto a las estimaciones de los valores proporcionados por el modelo y un coeficiente de determinación múltiple (Adj R-Sq) de 0.7350; se observa que la proteína A4113 posee una relación inversamente proporcional y significativa; cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas no se encuentran proteínas asociadas a estos cambios.

Tabla 92. Estadísticos para el modelo de predicción lineal múltiple del comportamiento del índice de calidad espermática de acuerdo a las concentraciones de proteínas.

Pr > F		0.0427
R-cuadrado		0.9180
Adj R-Sq		0.7375
Variable	Estimado	Pr > t
Término independiente	0.46290	0.1715
A2001	0.00301	0.8770
A5101	0.04533	0.0875
A4113	-0.03262	0.0301
A4119	-0.00814	0.5763
A3218	0.00357	0.5127
A2301	-0.00504	0.3660
A6310	-0.01503	0.6492
A409	0.01653	0.7739
A1407	-0.00684	0.8518
A507	-0.01487	0.7662
A4704	0.11247	0.0830

$$\begin{aligned} \text{Índice de calidad espermática} = & 0.46290 + (A2001*0.00301) + (A5101*0.04533) - \\ & (\mathbf{A4113*0.03262}) - (A4119*0.00814) + (A3218*0.00357) - (A2301*0.00504) - \\ & (A6310*0.01503) + (A409*0.01653) - (A1407*0.00684) - (A507*0.01487) + (A4704*0.11247) \\ & \text{Pr>F } 0.0427 \quad R^2 = 0.9180 \end{aligned}$$

Al hacer el análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS, se observa a nivel general que la proteína A4113 se encuentra relacionada inversamente con los cambios en el índice de calidad espermática ($\text{Pr} > F < .0001$), y cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas las proteínas A2001 y A4704 se encuentran asociadas inversamente mientras que la proteína A3218 está asociada directamente con el índice de calidad espermática en la raza Cebú; en la raza San Martinero no se encontraron proteínas asociadas a estos cambios (Tabla 93).

Tabla 93. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del índice de calidad espermática según la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General		SM		Cebú
Pr > F	<.0001		0.0014		n.e.
R-cuadrado	0.6943		0.9991		n.e.
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	
Término independiente	0.57545	<.0001	0.02320	0.1750	n.e.
A4113	-0.01759	<.0001			n.e.
A2001			0.02380	0.0151	n.e.
A3218			-0.01652	0.0042	
A4704			0.11608	0.0005	

n.e.: no estimado por el procedimiento

Del análisis de la información se generan los siguientes modelos:

$$\text{ICE a nivel General} = 0.57545 - (A4113 \cdot 0.01759)$$

$$\text{ICE toros San Martinero} = 0.023 + (A2001 \cdot 0.024) - (A3218 \cdot 0.017) + (A4704 \cdot 0.116)$$

$$\text{Pr}>F \ 0.0014 \ R^2 = 0.9991$$

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre el índice de calidad espermática y la concentración de las proteínas seleccionadas para la raza Cebú, las proteínas A2001 ($r=-,88$; $p<0.05$) y A2301 ($r=0.74$; $p=0.059$) evidencian un nivel de asociación inverso y directo, respectivamente, en forma significativa $\text{Pr}>F<0.05$ mientras que en el San Martinero no se encontraron proteínas relacionadas

En la figura 70 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios del índice de calidad espermática

VI.3.2.1.7. Producción de espermatozoides congelables (Número de pajillas congeladas)

Análisis de las diferencias en la producción de espermatozoides congelables entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis del número de pajillas congeladas obtenidas de la producción seminal mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió determinar que el modelo VCA es el que mejor explica el comportamiento de esta variable. Con este modelo se puede explicar con mayor aproximación que la raza y sus repeticiones afectaron el número de pajillas congeladas ($\text{Pr}>F <.0001$ y 0.0221 , respectivamente), mientras que su interacción no presentó efecto ($\text{Pr}>F$, 0.1504) (Tabla 94 y 95).

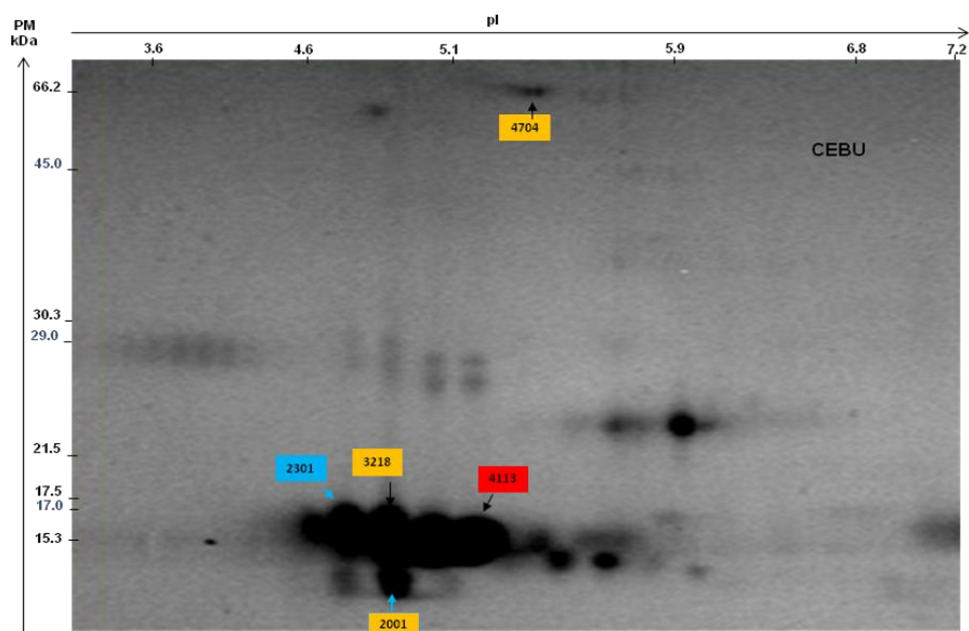


Figura 70. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul, mostaza y rojo, indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento del índice de calidad espermática para la raza Cebú, San Martinero y a nivel General respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4704, A3218, A2001, A2301 Y A4113).

Tabla 94. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre número de pajillas congeladas.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	365.6	383.1	362.2
RAZA	<.0001	<.0001	<.0001
REPETICION	0.0059	0.0005	0.0221
REPETICION*RAZA	0.1402	0.0095	0.1504

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general del número de pajillas congeladas para la raza San Martinero fue de 166.06 ± 35.54 . y para la raza Cebú 71.37 ± 31.59 (Tabla 68).

En cuanto a las repeticiones el promedio general fue mayor para la primera y tercera repetición, y un promedio inferior para la segunda repetición (Tabla 95).

Tabla 95. Efecto de la repetición sobre el número de pajillas congeladas.

Repetición	N	Mean	Std
1	14	131.84 ^a	43.82
2	14	98.60 ^b	63.51
3	14	125.71 ^a	63.98

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$)

Participación de las proteínas del plasma seminal en los cambios de espermatozoides congelables (número de pajillas)

En la Tabla 96 se puede apreciar el análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS. Los resultados indican que a nivel general la proteína A4113 se encuentra relacionada inversamente con el número de pajillas congeladas ($Pr > F < .0001$) y la A4704 en forma directa ($Pr > F < .0001$); cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas no se encuentran proteínas en la raza San Martinero relacionadas con el número de pajillas congeladas, mientras que en la raza Cebú la proteína A4704 se encontró asociada directamente a estos cambios y la A6310 asociada inversamente ($Pr > F 0.0070$).

Tabla 96. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del número de pajillas congeladas según la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	0.0017		n.e.		0.0070	
R-cuadrado	0.4935		n.e.		0.9635	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	129.98965	<.0001	n.e.	n.e.	7.56475	0.6732
A4113	-13.69056	<.0001
A4704	48.50547	0.0023	.	.	32.0913	0.0040
A6310	-17.26503	0.0198

n.e.: no estimado por el procedimiento

En la figura 71 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína en forma significativa que posiblemente tienen que ver con los cambios de producción de espermatozoides expresados en número de pajillas congeladas.

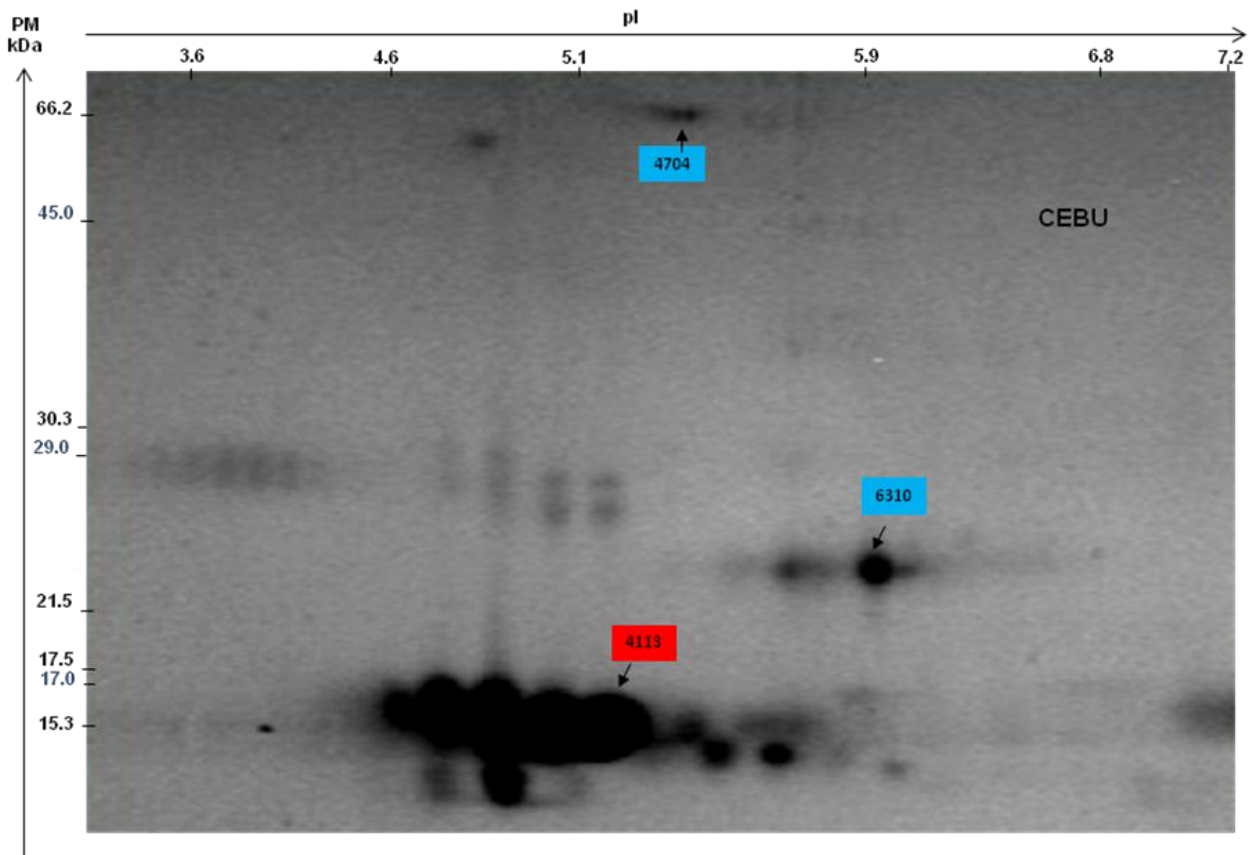


Figura 71. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul y rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de pajillas congelables para la raza Cebú y a nivel General respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4704, A6310 y A4113).

VI.3.2.2. Comportamiento de las variables de calidad espermática de semen post-descongelado asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero comparadas con el Cebú.

Para la determinación de la calidad espermática de semen post-descongelado se consideraron las variables motilidad, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática (Tabla 97).

Tabla 97. Efecto de la la raza San Martinero y Cebú sobre la calidad espermática post-descongelación.

Variable de calidad espermática	n	Raza San Martinero	n	Raza Cebú Brahman	p
Espermatozoides/pajilla		30x10 ⁶		30x10 ⁶	
Motilidad (%)*	35	41.49 ^a ± 5.43	35	35.66 ^b ± 4.93	0.0108
Viabilidad (%)**	35	62.77 ^a ± 3.12	35	52.97 ^b ± 6.10	0.0008
Morfología (% epz normales)	35	80.14 ^a ± 4.71	35	79.46 ^a ± 3.01	0.5688
ICE* (MOTIL. Viabil. Morf)	35	0.21±0.09	35	0.150±0.03	0.0017
Epz viables por pajilla*	35	6.26 ^a x10 ⁶ ± 0.43	35	4.50 ^b x10 ⁶ ± 0.38	0.0430

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0,05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0,001$) representado por (**). Las pajillas para congelación se empacaron a 30 x10⁶ epz/mL. ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermatica

Los resultados señalan, con respecto al efecto de la raza en la calidad espermática del semen post-descongelado, mejores valores de respuesta para la raza San Martinero en términos generales con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) para los promedios de la variable viabilidad; en forma significativa ($p < 0.05$) para las variables motilidad e índice de calidad espermática y no significativas ($p > 0.05$) para morfología. Al hacer el cálculo de espermatozoides viables por pajilla post-descongelación se observa que su concentración es mayor en la raza San Martinero en forma significativa ($p < 0.05$).

VI.3.2.2.1. Motilidad post-descongelación

Análisis del comportamiento de motilidad espermática post-descongelación entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la motilidad post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo partir del modelo VCA permitió explicar con mayor aproximación que la raza afectó la motilidad ($Pr > F$ 0,0180), mientras que las repeticiones y la interacción no presentaron efecto ($Pr > F$, 0.6574 y 0.6574, respectivamente) (Tabla 98). El promedio general de la motilidad post-descongelación para la raza San Martinero fue de 41.49 ± 5.43%, siendo mayor respecto a la Cebú la cual presentó un promedio de 35.66 ± 4.93% (Tabla 97).

Tabla 98. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la motilidad post-descongelación.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	390.4	406.6	388.5
RAZA	0.0112	0.0112	0.0108
REPETICION	0.6606	0.3752	0.6574
REPETICION*RAZA	0.6244	0.0846	0.5349

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*.

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú en la motilidad espermática post-descongelación.

Siguiendo la misma metodología de análisis de las variables anteriores, se observa que el comportamiento de la proteínas del plasma seminal entre raza con respecto a la motilidad espermática post-descongelación, mediante el procedimiento STEPWISE de SAS muestra que en la San Martinero la proteína A6310 podría estar asociada directamente a estos cambios ($Pr > F$ 0.0075 $R^2 = 0.57$) (Tabla 99).

Tabla 99. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la motilidad post-descongelación por efecto de la concentración de las proteínas.

	SM y Cebú		SM		Cebú	
Pr > F	n.e.		0.0075		n.e.	
R-cuadrado	n.e.		0.5663		n.e.	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	n.e.	n.e.	28.87249	<.0001	n.e.	n.e.
A6310			4.71417	0.0075		

n.e.: no estimado por el procedimiento

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre la motilidad post-descongelación y las proteínas seleccionadas se observa a nivel general que la proteína A2301 ($r = 0.31$; $p < 0.005$) presenta una asociación directa mientras que las proteínas A4119 ($r = -0.48$; $p < 0.001$) y A4113 ($r = -0.41$; $p < 0.05$) presentan una relación inversa con los cambios de motilidad. Al ser evaluados los coeficientes por raza, el punto de proteína A1407 se encuentra asociado en forma significativa ($r = -0.55$; $p < 0.05$) en la Cebú, mientras que en la raza San Martinero no se encuentra asociaciones relevantes (Tabla 100).

Tabla 100. Coeficiente de correlación parcial (r) y su probabilidad (Pr > |r|) de las proteínas respecto a la motilidad post-descongelación.

Proteína	General			San Martinero			Cebú		
	R	Pr > r	N	R	Pr > r	N	r	Pr > r	N
A4113	-0.4085	0.0109	38	-0.3553	0.1480	18	-0.2639	0.2609	20
A4119	-0.4799	0.0013	42	-0.3176	0.1606	21	-0.1791	0.4374	21
A2301	0.3139	0.0429	42	-0.1588	0.4918	21	0.4198	0.0582	21
A1407	-0.1682	0.3574	32	0.0987	0.6969	18	-0.5505	0.0413	14

En la figura 72 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la motilidad post-descongelación

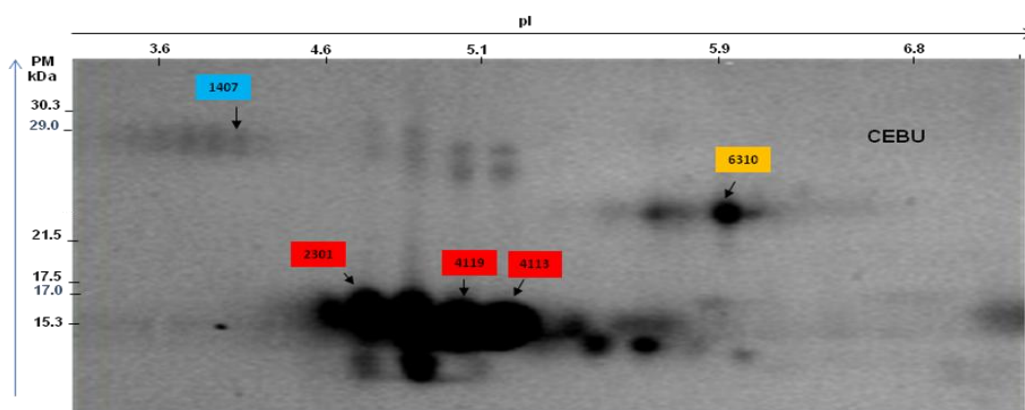


Figura 72. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul, mostaza y rojo, indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la motilidad espermática post-descongelación para la raza Cebú, San Martinero y a nivel general, respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A1407, A6310, A2301, A4119 Y A4113).

VI. 3.2.2.2 Viabilidad post descongelación

Análisis del comportamiento de la viabilidad espermática post-descongelación entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis del de la viabilidad post-descongelación como se indica en la Tabla 101, explica que la raza afectó la viabilidad post-descongelación (Pr>F 0.0008), mientras que sus repeticiones y la interacción no presentaron efecto (Pr>F 0.0825 y 0.2694, respectivamente).

Tabla 101. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la viabilidad post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	357.2	381.9	357.0
RAZA	0.0008	0.0008	0.0008
REPETICION	0.0949	0.0258	0.0825
REPETICION*RAZA	0.2861	0.2184	0.2694

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de la viabilidad post-descongelación para la raza San Martinero fue de $62.77 \pm 3.12\%$, y para la raza Cebú $52.97 \pm 6.10\%$ (Tabla 97).

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú en la viabilidad espermática post-descongelación.

En la figura 73 se pueden observar las posibles proteínas A2301 y A3218, A4119, A6310, A507, A409, A1407 y A5101 seleccionadas por análisis de componentes principales (ACP) con una explicación de la variación del 58.6% que podrían estar involucradas en el comportamiento de la viabilidad espermática post descongelación.

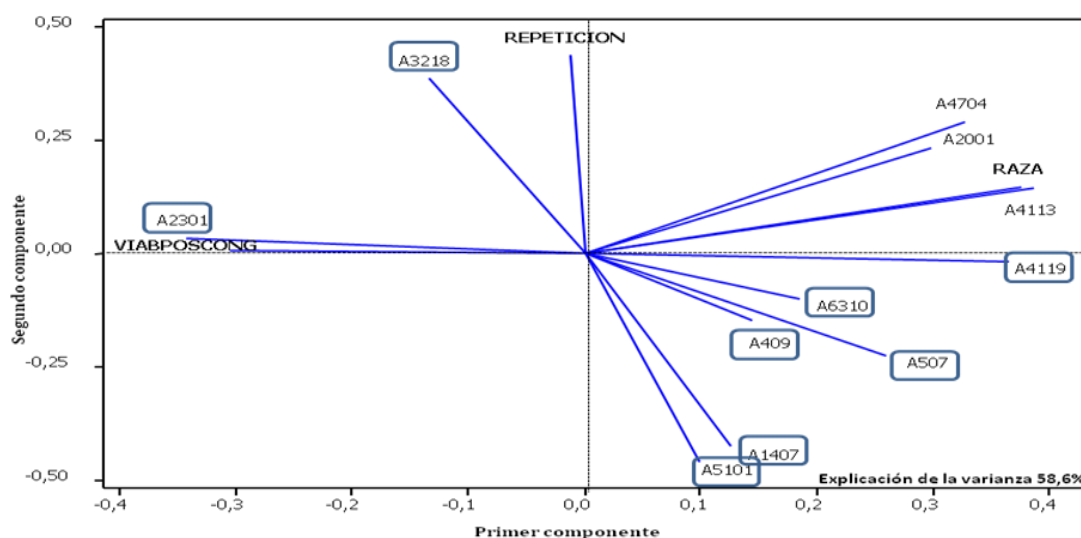


Figura 73. Proteínas que intervienen en la variación de la viabilidad post-descongelación a través del análisis de componentes principales.

Al realizar el análisis de la información involucrando estas proteínas seleccionadas por ACP, regresión polinomial, se observa que a pesar de la diferencia entre las 2 razas, sólo se encuentra efecto a nivel general Pr>F de 0.0004, R² de 0.6524 y un ajustado de 0.5655 en cabeza de la proteína A4119 para la raza San Martinero y Cebú los modelos no son significativos. (Tabla 102).

Tabla 102. Estadísticos del modelo de regresión polinomial del comportamiento de la viabilidad post-descongelación por efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas ACP.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	0.0004		0.2319		0.4087	
R-cuadrado	0.6524		0.4847		0.5541	
Adj R-Sq	0.5655		0.1984		0.1082	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	67.1760	<.0001	67.8526	<.0001	74.8400	0.0032
A4119	-0.7071	0.0016	-0.3385	0.3998	-1.0186	0.1689
A6310	0.7616	0.2955	0.1423	0.8905	1.2060	0.4065
A1407	-0.0781	0.9406	0.1314	0.9086	0.0136	0.9964
A5101	-0.7115	0.1672	-0.4142	0.4276	-2.6171	0.1871
A4113	-0.1699	0.2886	-2.2821	0.1684	-0.0621	0.8773

n.e.: no estimado por el procedimiento

Al someter estas proteínas al procedimiento STEPWISE de SAS, se observa a nivel general, que la proteína A4119 está relacionada inversamente, al igual que la A4113 para la raza San Martinero; para el Cebú no se determinaron proteínas relacionadas (Tabla 103).

Tabla 103. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento de la viabilidad post- descongelación en razón a la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	<.0001		0.0136		n.e.	
R-cuadrado	0.5857		0.3850		n.e.	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	67.0302	<.0001	65.9460	<.0001		
A4119	-0.8326	<.0001	.	.		
A4113	.	.	-3.0691	0.0136		

En la figura 74 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la viabilidad post-descongelación.

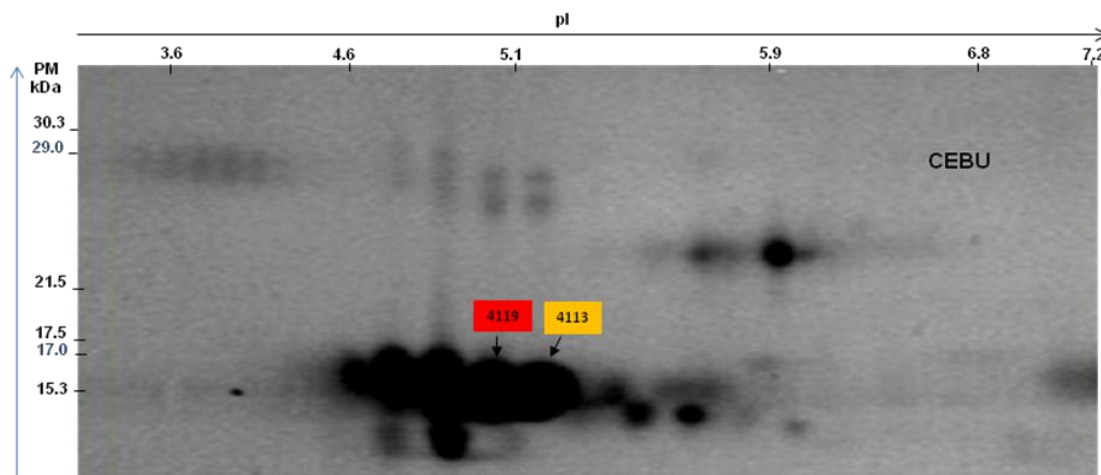


Figura 74. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color mostaza y rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el comportamiento de la viabilidad espermática post-congelación para la raza San Martinero y a nivel General respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización de los puntos A4119 y A4113).

VI. 3.2.2.3. Morfología post-descongelación

Análisis del comportamiento de la morfología espermática pos-descongelación en las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la morfología espermática post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo a partir del modelo VCA explica que la raza, las repeticiones y la interacción no afectaron esta variable ($Pr > F$ 0.5688, 0.9272 y 0.1302, respectivamente) (Tabla 104).

Tabla 104. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre de la morfología post-descongelación.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	361.6	384.2	361.4
RAZA	0.5715	0.5715	0.5688
REPETICION	0.9334	0.9479	0.9272
REPETICION*RAZA	0.1331	0.3010	0.1302

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general de espermatozoides con morfología normal post-descongelación para la raza San Martinero fue de 80.14 ± 4.71 y para Cebú de $79.46 \pm 3.01\%$ (Tabla 97).

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú en la morfología espermática post-descongelación.

Determinado el modelo general y al realizar el análisis mediante el modelo de regresión lineal múltiple para identificar puntos de proteína que tengan efecto sobre la morfología post-descongelación, se encontró que el modelo de regresión no explica en conjunto efecto alguno de los puntos de proteína sobre las variaciones en la morfología ($Pr > F$ 0.5169; R^2 0.6967 y R^2 ajustado 0.0294). Cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas de igual forma no se encuentran proteínas asociadas a estos cambios.

En la búsqueda de grupos de proteínas que puedan estar participando en el comportamiento de la morfología post-descongelación espermática, se seleccionaron variables mediante el análisis de componentes principales (ACP) y se observó que las posibles proteínas involucradas en el comportamiento de esta variable serían la A4113, A2001 y A4704 con una explicación de la variación del 55.6% (Figura 75).

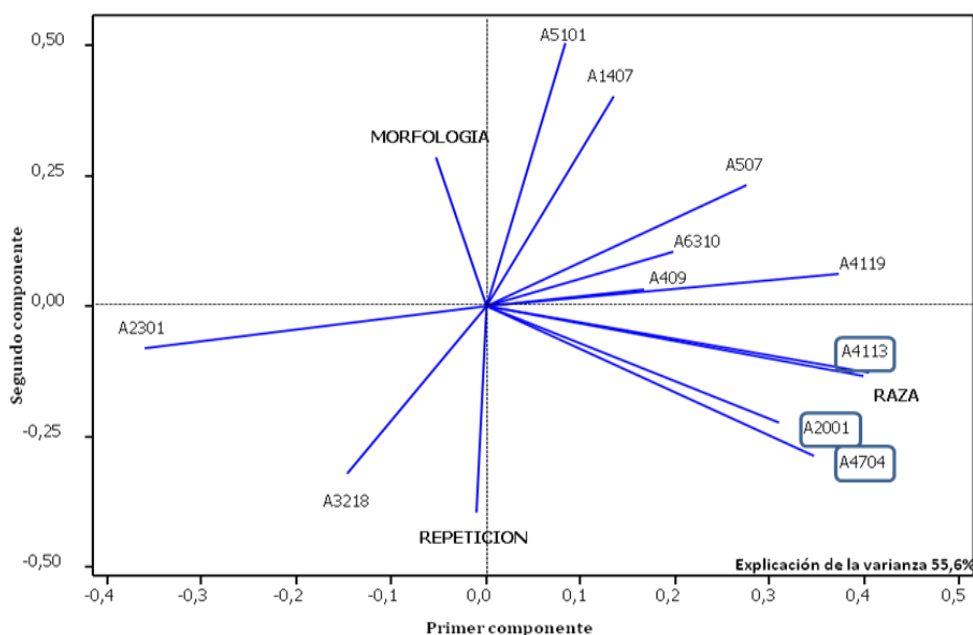


Figura 75. Proteínas que intervienen en la expresión de la morfología post-descongelación a través del análisis de componentes principales.

Al hacer el análisis de la información involucrando las proteínas seleccionadas mediante el ACP, regresión polinomial sólo se observa efecto a nivel general ($Pr > F$ 0.0415; R^2 0.5208 y R^2 ajustado 0.3411); para la raza SM y Cebú los modelos no son significativos (Tabla 105).

Tabla 105. Estadísticos del modelo regresión polinomial del comportamiento de la morfología post-descongelación por efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas por ACP.

	General	SM	Cebú
Pr > F	0.0415	0.2022	0.2526
R-cuadrado	0.5208	0.6250	0.9075
Adj R-Sq	0.3411	0.3036	0.6300

Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	92.0009	<.0001	95.6516	<.0001	86.6281	0.0031
A2301	-0.2714	0.0728	-0.3911	0.1113	-0.0806	0.7436
A6310	-0.9404	0.2338	-1.8896	0.1451	0.5540	0.4356
A409	-1.7688	0.1072	-3.9143	0.1082	-1.4077	0.1477
A1407	-0.9730	0.4113	-2.6270	0.1914	-0.4887	0.6489
A507	2.4095	0.0759	5.1371	0.0741	1.3449	0.3867
A4704	-2.2663	0.0119	-1.5522	0.4993	-2.3066	0.0772

n.e.: no estimado por el procedimiento

El análisis de la información a nivel general generará el siguiente modelo:

$$\text{Morfología post-descongelación} = 92 - (A2301 \times 0.27) - (A6310 \times 0.94) - (A409 \times 1.77) - (A1407 \times 0.97) + (A507 \times 2.4) - (A4704 \times 2.27)$$

$$\text{Pr}>F \ 0.0415 \ R^2 = 0.52$$

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre la morfología y la concentración de las proteínas a nivel general se observa que el punto de proteína A4704 presentó una relación inversa y significativa ($r = -0.4322$; $p < 0.05$).

En la figura 76 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de la morfología post-descongelación.

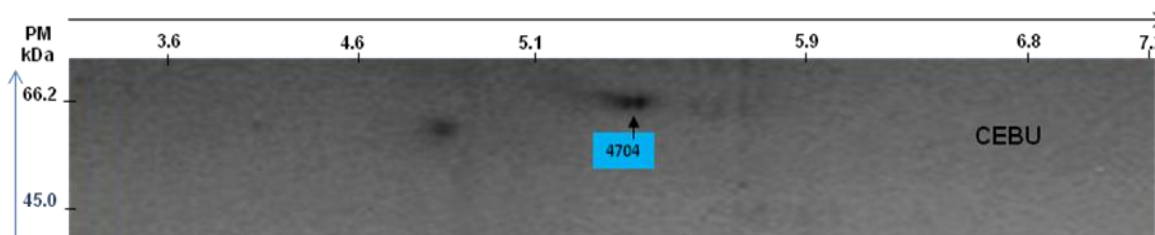


Figura 76. Mapa electroforético 2D SDS-PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. La posición del punto de proteína señalado en color azul indica el punto con cambio significativo que estaría afectando el comportamiento de la morfología espermática post-descongelación para la raza Cebú. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A4704).

VI. 3.2.2.4. Índice de calidad espermática post-descongelación.

Análisis del comportamiento del índice de calidad espermática post-descongelación entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis del índice de calidad post-descongelación mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo permitió explicar que la raza afectó el índice de calidad post-descongelación ($Pr > F$ 0.0015), mientras que sus repeticiones y la interacción no presentaron efecto ($Pr > F$ 0.3753 y 0.9835, respectivamente) (Tabla 106).

Tabla 106. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre el índice de calidad post descongelación. Modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	-23.3	1.8	-26.7
RAZA	0.0015	0.0015	0.0015
REPETICION	0.3954	0.5112	0.3753
REPETICION*RAZA	0.985	0.9836	0.9835

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

El promedio general del índice de calidad post-descongelación para la raza San Martinero fue de 0.21 ± 0.09 y para la raza Cebú 0.15 ± 0.003 (Tabla 97).

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú sobre el índice de calidad espermática post-descongelación (ICE PDC)

Determinado el modelo y al realizar el análisis de la información proteica con el procedimiento STEPWISE de SAS se observa que los modelos expresan efectos significativos a nivel general y para la raza San Martinero ($Pr > F$ 0.0030 y 0.0012 respectivamente). A nivel general, se observa que la proteína A5101 se encuentra relacionada directamente con los cambios en el índice de calidad post-descongelación ($Pr > F$ 0.0030) y la proteína A4119, inversamente ($Pr > F$ 0.0012); cuando se realiza el procedimiento para cada una de las razas no se encuentran proteínas en la raza Cebú relacionadas con el índice de calidad post-descongelación, mientras que en la raza San Martinero se encontró la proteína A6310 que podría estar asociada directamente a estos cambios ($p < 0.05$) (Tabla 107).

Tabla 107. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del índice de calidad post-descongelación según la concentración de las proteínas.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	0.0030		0.0012		n.e.	
R-cuadrado	0.5647		0.7067		n.e.	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	0.8672	<.0001	0.27637	0.0105	n.e.	n.e.
A5101	0.04424	0.0499	.	.		
A4119	-0.04326	0.0010	.	.		
A6310			0.16885	0.001		

n.e.: no estimado por el procedimiento

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre el índice de calidad espermática y la concentración de las proteínas entre razas se observa que las proteínas A4704 ($r=-0.43$; $p<0.05$), A4113 ($r=-0.62$; $p<0.001$) y A4119 ($r=-0.59$; $p<0.001$) presentan una relación inversa y significativa y la A2301 ($r=0.35$; $p<0.05$) directa y significativa. En la raza San Martinero la proteína A6310 ($r=0.55$; $p<0.05$) presenta una relación directa y significativa; dentro de la raza Cebú la proteína A1407 ($r=-0.57$; $p<0.05$) tiene una relación inversa y significativa.

En la figura 77 se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que en forma significativa posiblemente tienen que ver con los cambios del índice del ICE PDC.

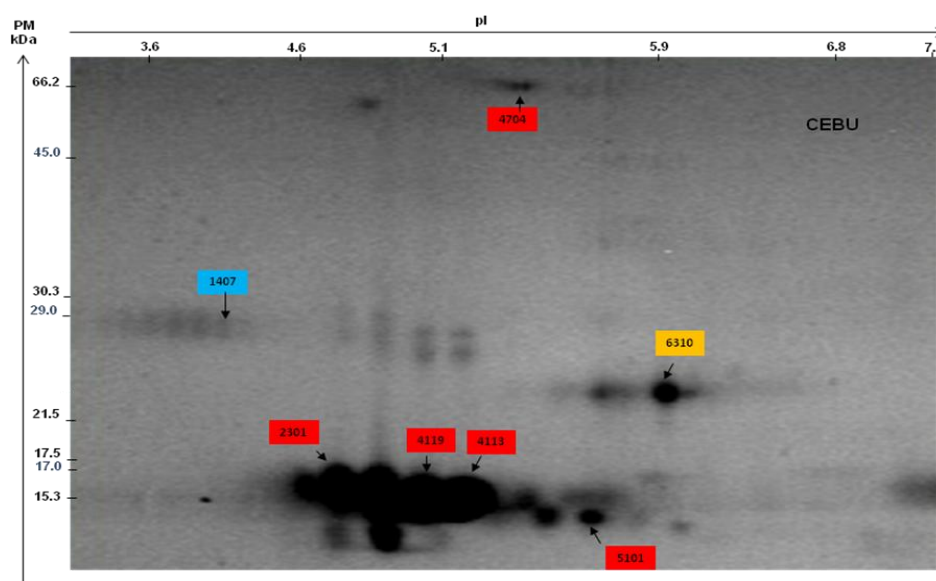


Figura 77. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color mostaza y rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando el índice de calidad espermática post-

descongelación para la raza San Martinero y a nivel general respectivamente. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A4704, A4119, A4113 y A6310).

VI. 3.2.3. Comportamiento de las variables del proceso de fecundación asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero y Cebú brahman

VI. 3.2.3.1. Porcentaje de fertilidad (2PN)

Análisis del comportamiento de la fertilidad *in vitro* entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis de la variable 2PN mediante modelos mixtos y medidas repetidas en el tiempo, permitió establecer el modelo VCA como el que mejor explica el efecto. El análisis evidenció que sólo la raza afecta ($Pr > F$ 0.006) a la variable 2PN (Tabla 108). El promedio general de 2PN para la raza San Martinero fue de $65.30 \pm 8.95\%$, siendo mayor respecto a la Cebú la cual presentó un promedio de $57.95 \pm 9.11\%$ (Tabla 109)

Tabla 108. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre la variable 2PN. Modelo mixtos con medidas repetidas en el tiempo.

	VCCS	VCU	VCA
BIC	464.8	481.8	464.1
RAZA	0.0075	0.0075	0.0061
REPETICION	0.6400	0.1482	0.5952
REPETICION*RAZA	0.7287	0.6038	0.7170

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*.

Tabla.109 Efecto de la raza San Martinero y Cebú sobre la variable 2PN.

Variable de calidad espermática	n	Raza San Martinero	n	Raza Cebú Brahman	p
Fertilidad (2PN)*	35	$65.30^a \pm 8.95$	35	$57.95^b \pm 9.117$	0.0061

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**). Las pajillas para congelación se empacaron a 30×10^6 epz/mL

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú sobre la fertilidad *in vitro*

Al realizar la selección de proteínas que pueden explicar los cambios observados en 2PN mediante el análisis de componentes principales (ACP) se observa que las posibles proteínas involucradas en el comportamiento de 2PN son la A2301, A3218, A4119, A6310, A507, A409, A1407 y A5101, con una explicación de la variación del 55,3% (figura 78).

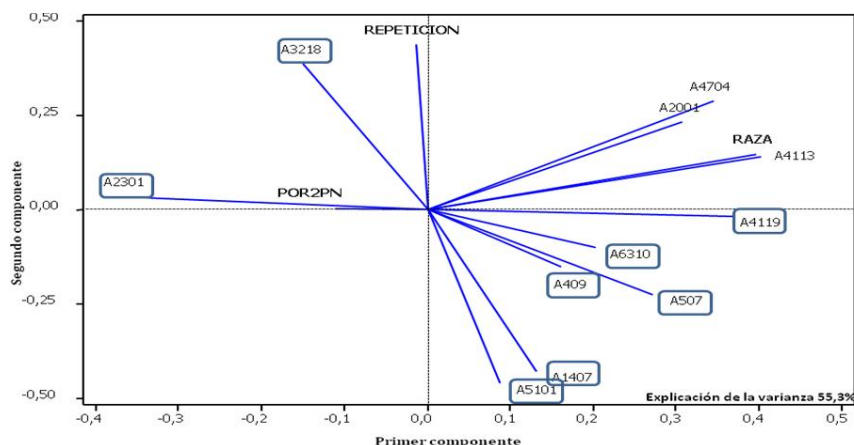


Figura 78. Proteínas que intervienen en la expresión de la fertilidad *in vitro* a través del análisis de componentes principales.

Al hacer el análisis mediante modelos de regresión polinomial de la información involucrando estas proteínas seleccionadas por ACP se aprecia que sólo se encuentra efectos significativos para la raza Cebú en este modelo ($Pr > F$ 0.0153. R^2 0.9477 y R^2 ajustado de 0.8693) (Tabla 110).

Tabla 110. Estadísticos del modelo de regresión polinomial del comportamiento de 2PN or efecto de la concentración de las proteínas seleccionadas por ACP.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	0.0798		0.2908		0.0153	
R-cuadrado	0.4693		0.6696		0.9477	
Adj R-Sq	0.2702		0.2732		0.8693	
Variable	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t	Estimado	Pr > t
Término independiente	65.2221	<.0001	83.0344	0.0024	78.8386	0.0048
A4113	0.1277	0.8231	15.7548	0.1343	1.3327	0.0819
A2001	0.3842	0.7247	2.8497	0.0925	-4.7347	0.0102
A4704	-7.0550	0.0353	-13.9701	0.0931	-6.4862	0.0250
A4119	1.1537	0.0768	-4.6404	0.1618	1.2099	0.2738
A409	-4.9982	0.0830	-16.1184	0.0652	-7.9749	0.0079
A507	1.7267	0.6170	13.4340	0.0929	-0.0491	0.9920

n.e.: no estimado por el procedimiento

Del análisis anterior se generaría el siguiente modelo para la raza Cebú:

$$2PN = 78.8 + (A4113 \times 1.33) - (A2001 \times 4.73) - (A4704 \times 6.49) + (A4119 \times 1.21) - (A409 \times 7.97) - (A507 \times 0.049)$$

Pr>F 0.0798 R² = 0.9477

En la figura 79, se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que posiblemente en forma significativa tienen que ver con los cambios de fertilidad *in vitro*.

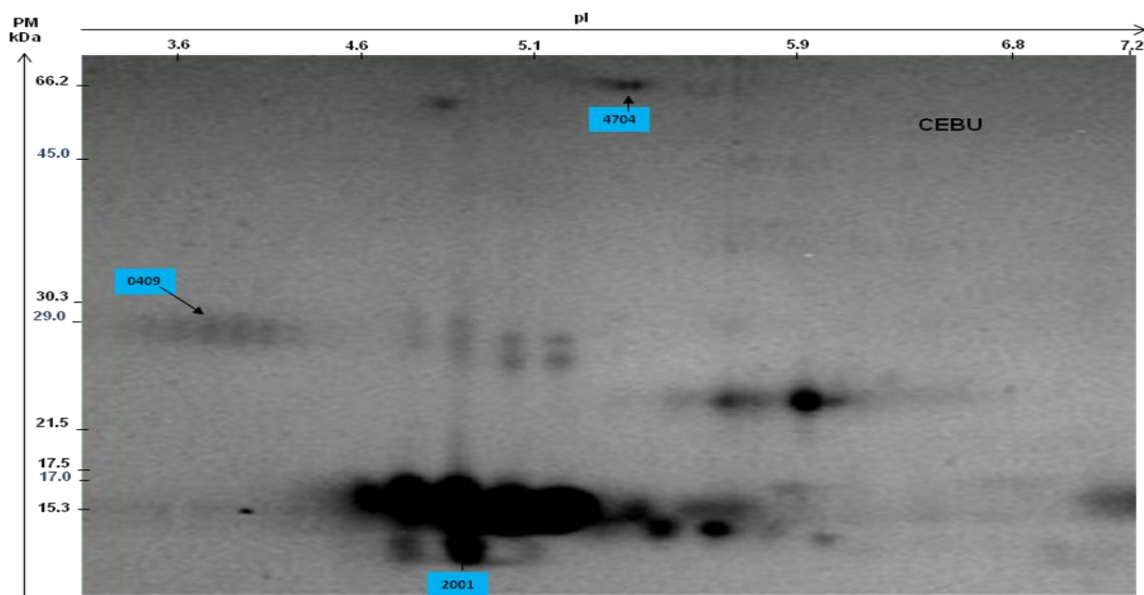


Figura 79. Mapa electroforético 2D SDS-PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando la variable 2PN para la raza Cebú. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A2001, A4704 Y A409).

VI. 3.2.4. Comportamiento de las variables de la producción de blastocistos asociadas a las proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero y Cebú Brahman

Análisis del comportamiento de la producción de blastocistos entre las razas San Martinero y Cebú

El análisis del porcentaje de blastocistos permite explicar que la raza, repeticiones y su interacción no afectaron el porcentaje de blastocistos (Pr>F 0.0508, 0.8273 y 0.3888,

respectivamente), sin embargo el nivel de significancia del efecto raza esta muy cercano al alfa establecido (Tabla 111).

Tabla 111. Efecto de la raza, repetición y su interacción sobre el porcentaje de blastocistos. Modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo

	VCCS	VCU	VCA
BIC	441.5	462.2	436.7
RAZA	0.0497	0.0497	0.0508
REPETICION	0.8693	0.8297	0.8273
REPETICION*RAZA	0.3923	0.4932	0.3888

BIC – Criterio de información bayesiano; VCCS – *Variance Components, Compound Symmetry*; VCU – *Variance Components, Unstructured*; VCA – *Variance Components, Autoregressive*

En la Tabla 112 se observa una tendencia a ser mayor el promedio general del porcentaje de blastocistos para la raza San Martinero respecto a la Cebú (32.12 ± 7.75 y $25.35 \pm 8.35\%$, respectivamente) ($p = 0.0508$).

Tabla.112. Efecto de la raza San Martinero y Cebú sobre la producción de blastocistos *in vitro*.

Variable de calidad espermática	n	Raza San Martinero	n	Raza Cebú Brahman	P
Porcentajes de Blastocistos)*	35	$32.12^a \pm 7.75$	35	$25.35^b \pm 8.35$	0.0508

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**). Las pajillas para congelación se empacaron a 30×10^6 epz/mL

Participación de las proteínas del plasma seminal obtenido de las razas San Martinero y Cebú sobre la producción de blastocistos.

Seleccionado el modelo, al realizar el análisis de la información con el procedimiento STEPWISE de SAS para las dos razas, se observa que la proteína A409 es la que se encuentra relacionada inversamente con los cambios en el porcentaje de blastocistos ($Pr > F < 0.0070$); cuando el procedimiento se efectúa para cada una de las razas no se encuentran proteínas en la raza San Martinero relacionadas con el porcentaje de blastocistos, mientras que en la raza Cebú se encontró la proteína A409 que podría estar asociada a estos cambios ($Pr > F < 0.0261$) (Tabla 113).

Tabla 113. Estadísticos del procedimiento STEPWISE de SAS del comportamiento del porcentaje de blastocistos según la concentración de las proteínas seleccionadas.

	General		SM		Cebú	
Pr > F	0.0070		n.e.		0.0261	
R-cuadrado	0.3939		n.e.		0.7485	
Variable	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F	Estimado	Pr > F
Término independiente	41.04267	<.0001	n.e.	n.e.	47.0767	0.0015
A409	-10.40197	0.0070	.	.	-13.48417	0.0261

n.e.: no estimado por el procedimiento

Al calcular los coeficientes de correlación parciales entre el porcentaje de blastocistos y la concentración de las proteínas se observa a nivel general que la proteína A4113 presenta una relación inversa y significativa ($r=-0.35$; $p<0.05$); dentro de la raza Cebú la proteína A409 tiene una relación inversa y cerca de ser significativa ($r=-0.46$; $p=0.0567$); para la raza San Martinero no se encontraron proteínas significativas.

En la figura 80, se puede observar la ubicación de los puntos de proteína que en forma significativa posiblemente tienen que ver con los cambios de producción de blastocistos.

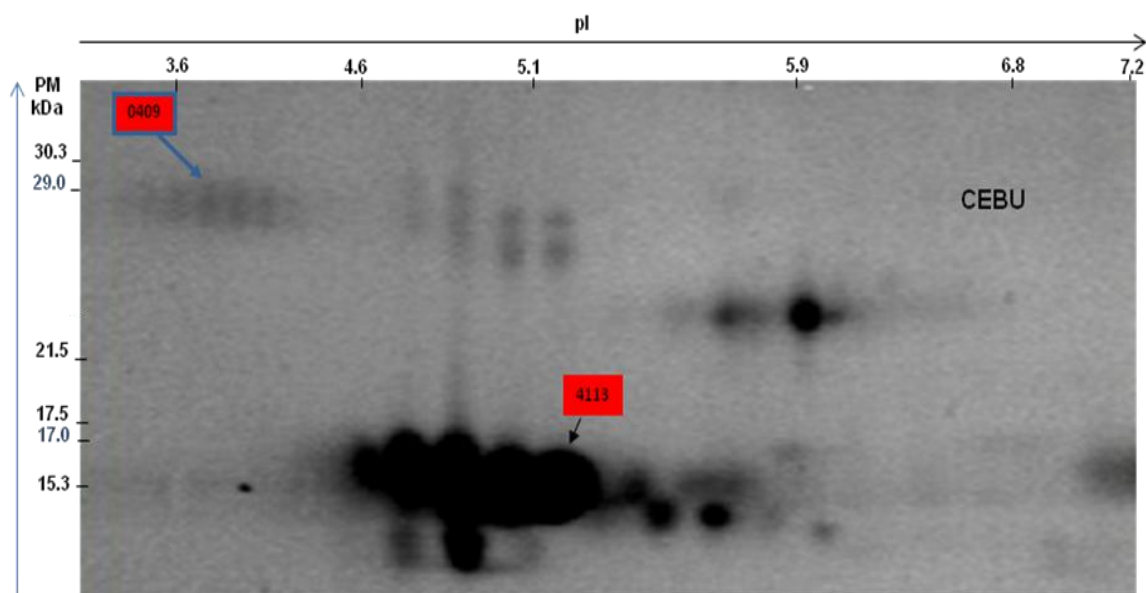


Figura 80. Mapa electroforético 2D PAGE de proteínas de plasma seminal de toros Cebú. Las posiciones de los puntos de proteína señalados en color azul y rojo indican los puntos con cambios significativos que estarían afectando la producción de blastocistos para la raza Cebú y a nivel general. La ubicación de los marcadores de peso molecular y puntos isoeléctricos se

señala a la izquierda y arriba de la figura. Mapa real (Imagen del área de visualización del punto A4704, A409 y A2001).

VI. 3.2.5. Concentración de proteínas del plasma seminal en el ganado San Martinero y Cebú Brahman

El análisis de cada una de las proteínas mediante modelos mixtos con medidas repetidas en el tiempo por raza, permitió determinar que el mejor arreglo de covarianzas se obtiene a partir del modelo VCA (Tabla 114). Con este modelo se puede explicar que la concentración de los puntos de proteína A6310 y A4704 difiere en forma significativa ($p < 0.05$) y los puntos de proteína A4113, A4119, A2301 de forma altamente significativa ($p < 0.001$) entre las dos razas. Se observan además cambios significativos para la interacción repetición por raza, para los puntos de proteína A5101, A4119, A4704 ($p < 0.05$).

Tabla 114. Análisis de modelos mixtos de las proteínas del plasma seminal considerando la raza, la repetición y la interacción repetición-raza. Los cuadros resaltados representan las proteínas con cambios significativos y los números resaltados los niveles de significancia.

	A2001			A5101			A4113			A4119		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	164.9	196.6	161.8	152.7	180.1	150.6	198.5	223.9	194.8	197.6	230.0	196.2
RAZA	0.1384	0.1310	0.1546	0.0961	0.0920	0.0695	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
REPETICION	0.8866	0.9056	0.8896	0.3012	0.2164	0.1868	0.2116	0.2268	0.1972	0.759	0.7334	0.7254
RxR	0.6324	0.6348	0.6234	0.0454	0.0224	0.0194	0.2082	0.2825	0.1968	0.0533	0.0228	0.0223

	A3218			A2301			A6310			A409		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	250.5	282.5	250.5	245.2	267.6	243.0	137.6	161.0	137.5	96.1	114.8	96.0
RAZA	0.2610	0.2610	0.2594	<.0001	<.0001	<.0001	0.0237	0.0265	0.0212	0.1016	0.0890	0.1010
REPETICION	0.1005	0.0394	0.1027	0.7481	0.6705	0.7665	0.8387	0.8458	0.8343	0.7589	0.6002	0.7682
RxR	0.8561	0.8035	0.8555	0.8554	0.8466	0.8363	0.5969	0.4958	0.6198	0.9551	0.8386	0.9545

	A1407			A507			A4704		
	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA	VCCS	VCU	VCA
BIC	71.5	98.5	66.6	95.8	124.7	95.8	93.7	105.9	91
RAZA	0.4462	0.4443	0.3993	0.3939	0.3595	0.3939	0.0060	0.0393	0.0111
REPETICION	0.4526	0.4488	0.4355	0.6129	0.4851	0.6130	0.1490	0.0020	0.1192
RxR	0.2009	0.2536	0.3001	0.8913	0.8139	0.8913	0.0123	0.1208	0.0100

BIC – Criterio de inrelación bayesiano. VCCS – Variance Components. Compound Symmetry VCU – Variance Components. Unstructured VCA – Variance Components, Autoregressive

En la Tabla 115 se puede observar el comportamiento de los valores promedios de la concentración de los puntos de proteínas del plasma seminal en la época lluviosa y seca. Los puntos de proteína A5101, A4113, A4119, A2301, A6310 y A4704 indican cambios significativos.

Tabla 115 Promedios de concentración de proteínas del plasma seminal de toros San Martinero y Cebú

Variable	San Martinero		Cebú	
	n	Promedio	n	Promedio
A2001	19	3.60 ^a ± 2.23	21	4.69 ^a ± 1.72
A5101*	21	2.75 ^b ± 1.72	19	3.57 ^a ± 2.06
A4113*	18	1.62 ^b ± 0.82	20	11.77 ^a ± 5.68
A4119*	21	6.66 ^b ± 2.80	21	15.51 ^a ± 3.32
A3218	21	17.25 ^a ± 6.28	21	14.73 ^a ± 5.89
A2301*	21	19.20 ^a ± 6.91	21	8.72 ^b ± 3.36
A6310*	19	2.16 ^b ± 0.94	21	3.39 ^a ± 1.61
A409	18	1.20 ^a ± 0.82	18	1.74 ^a ± 0.86
A1407	18	1.32 ^a ± 0.82	14	1.57 ^a ± 0.60
A507	19	1.54 ^a ± 0.94	18	1.81 ^a ± 0.67
A4704*	20	1.55 ^b ± 1.20	14	2.85 ^a ± 0.98

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**).

En la Tabla 116 se pueden observar los puntos de proteína, A5101, A4119, A4704 que mostraron alguna interacción entre la raza y los muestreos.

Tabla 116. Promedios de concentración de proteínas del plasma seminal en cada uno de los muestreos para las dos razas San Martinero y Cebú.

Raza	Repetición	A5101			A4119			A4704		
		n	Mean	Std	n	Mean	Std	n	Mean	Std
CEBU	1	7	2.45 ^{ab}	1.09	7	17.60 ^a	3.07	7	1.69 ^b	1.06
	2	6	3.06 ^{ab}	0.79	7	14.9 ^a	3.45	5	2.74 ^a	0.61
	3	6	5.38 ^a	2.68	7	14.03 ^a	2.26	6	3.51 ^a	0.63
SM	1	7	2.96 ^{ab}	2.52	7	5.55 ^b	3.11	6	2.4 ^a	1.83
	2	7	2.99 ^{ab}	1.49	7	6.70 ^b	2.2	7	0.78 ^b	0.48
	3	7	2.29 ^b	0.94	7	7.75 ^b	2.96	7	1.59 ^b	0.31

Letras diferentes indican diferencias significativas ($Pr > F < 0.05$) representado por (*) ó altamente significativas ($Pr > F < 0.001$) representado por (**).

VI.3.3. Promedios de variables de calidad de espermatozoides pre y post-congelados y resultados de fertilidad *in vivo* e *in vitro* en los toros San Martinero

Al revisar los resultados de las Tablas 23, 43, 68 y 97 se observa que la respuesta obtenida de los toros criollos San Martinero está en el rango superior comparado con los toros Cebú. Sin embargo, para evaluar los toros más sobresalientes de cada raza, se seleccionaron dos grupos considerando los promedios de la respuesta de cada variable de calidad espermática en fresco y post-descongelación, fertilidad y producción de blastocistos (los de mayor y menor promedio)

VI.3.3.1. Valores de mayor y menor promedio para las variables de calidad espermática del semen fresco de los toros San Martinero.

Para seleccionar los mejores animales en este criterio, el estudio tuvo en cuenta el valor del índice de calidad espermática (Tabla 117), que integra la concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática. Las variables integradas en el índice señalan poca variación, sin embargo se observa a los toros codificados 2 y 4 como los mejores promedios de índice de calidad (0.55 ± 0.09 y 0.59 ± 0.16) y a los codificados como 1 y 5 (0.48 ± 0.21 y 0.45 ± 0.12), como el menor promedio.

Tabla 117. Promedios de variables de calidad espermática en fresco de los toros criollos San Martinero en estudio.

TORO	1	2	3	4	5	6	7
repeticione	3	3	3	3	3	3	3
Vol \pm DS	10.42 \pm 2.84	6.58 \pm 2.13	7.75 \pm 2.25	8.00 \pm 2.53	8.58 \pm 2.92	5.50 \pm 2.72	7.33 \pm 2.27
Conc \pm DS	1018.5 \pm 138.66	1,011.17 \pm 173.06	1,035.00 \pm 129.42	1,035.50 \pm 232.66	1,094.50 \pm 172.34	969.17 \pm 113.80	1,097.33 \pm 175.23
Mot \pm DS	78.33 \pm 19.66	83.33 \pm 4.08	81.67 \pm 11.25	82.83 \pm 4.02	74.17 \pm 11.14	75.83 \pm 10.68	83.33 \pm 8.76
Viab \pm DS	67.33 \pm 25.07	77.67 \pm 7.12	73.33 \pm 5.92	76.33 \pm 7.34	68.83 \pm 8.35	69.83 \pm 7.68	76.00 \pm 8.65
Epz Nor \pm DS	82.50 \pm 4.1	85.17 \pm 7.41	80.17 \pm 0.75	89.67 \pm 6.12	80.83 \pm 4.49	93.17 \pm 2.23	77.50 \pm 5.09
ICE \pm DS	0.44 \pm 0.21	0.55 \pm 0.09	0.49 \pm 0.08	0.59 \pm 0.16	0.45 \pm 0.12	0.49 \pm 0.14	0.54 \pm 0.11

ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

El segundo criterio de clasificación: Evaluación del número de pajillas congeladas por eyaculado de concentración espermática definida (30×10^6 Epz) que pasaron las pruebas de calidad y de almacenaje de cada toro evaluado permitieron identificar a los toros codificados como 2 y 4 (18.18 ± 5.97 y 19.01 ± 5.84) seguidos por el toro codificado como 6 (17.65 ± 11.47) como los toros que obtuvieron mayores promedios y los toros codificados como 3 y 5 (16.24 ± 4.93 y 15.03 ± 5.69) aquellos que obtuvieron menores promedios. En esta prueba se observa que los toros codificados como 2, 4 y 6 presentaron los mejores promedios al compararlos con el 3 y 5 (Tabla 118).

Tabla 118. Promedios del número de pajillas congeladas por mililitro de semen fresco en los toros criollos San Martinero.

TORO	1	2	3	4	5	6	7
repeticiones	3	3	3	3	3	3	3
n°pajillascongeladas ± DS	17.31±8.84	18.18±5.97	16.24±4.93	19.01±5.84	15.03±5.69	17.65±11.47	17.60±6.36

VI.3.3.2. Valores de las variables de mayor y menor promedio para calidad espermática post-descongelación en los toros San Martinero.

Con el mismo criterio realizado en el punto anterior los resultados de comportamiento de los toros de mayor y menor respuesta en las variables de calidad espermática post-descongelación indican para el ICE al toro 2 y 6 como los de mayor promedio seguidos del toro 4 y al toro 3 como de menor promedio (Tabla 119).

Tabla 119. Porcentajes de los promedios de calidad espermática post-descongelación en los toros criollos San Martinero

TORO	1	2	3	4	5	6	7
Repeticiones	5	5	5	5	5	5	5
Mot prog indiv (%) ± DS	38.80±6.66	40.20±5.81	36.80±3.36	43.20±3.36	38.30±3.33	45.80±4.69	39.10±3.11
Viabilidad (%) ±DS	60.20±3.19	61.20±4.13	59.70±4.67	60.00±5.62	60.50±4.09	62.60±3.63	59.20±5.45
Epz Normales % ± DS	77.60±3.17	79.90±4.09	74.20±4.32	79.80±4.85	78.40±3.03	78.80±5.85	75.80±5.98
ICE ± DS	0.18±0.05	0.18±0.06	0.17±0.03	0.18±0.04	0.17±0.05	0.18±0.05	0.17±0.05

ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

VI.3.3.3. Valores de las variables de mayor y menor promedio de fertilidad y desarrollo embrionario *in vivo* e *in vitro*

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 120, en donde los mayores promedios para la variable fertilidad *in vitro* se dan para los toros 2 y 6 (68.42±5.28 y 69.06±7.49), seguidos del toro 3 y los menores promedios para los toros 1 y 7 (59.19±10.34 y 58.28±9.31).

Tabla 120. Porcentajes de los promedios de fertilidad *in vitro*, en los toros criollos San Martinero.

TORO	1	2	3	4	5	6	7
Repeticiones	5	5	5	5	5	5	5
Fertilidad <i>in vitro</i> (%) ± DS	59.19±10.34	68.42±5.28	67.17±5.86	62.30±9.06	67.10±8.15	69.06±7.49	58.28±9.31

Una de las variables respuesta importante es la producción de blastocistos. En este sentido, en la Tabla 121 se observan que los mayores promedios están dados para los toros 2 y 6 (35.55±4.00 y 38.84±4.30) seguidos del toro 4 y los menores promedio para los toros 3 y 5 (23.30±8.99 y 25.68±6.72).

Tabla 121. Porcentajes de los promedios producción de blastocistos *in vitro* en los toros criollos San Martinero

TORO	1	2	3	4	5	6	7
Repeticiones	5	5	5	5	5	5	5
BLASTOCISTOS (%)± DS	31.24±3.75	35.55±4.00	23.30±8.99	33.17±3.76	25.68±6.72	38.84±4.30	29.13±4.21

Finalmente, el criterio de fertilidad *in vivo* de los toros San Martinero monitoreados por 3 años con exposición a grupos de 20 hembras de la misma raza anualmente señala las mayores respuestas para los toros 6, 4 y 2 (72.22±4.96, 70.00±7.62 y 67.86±4.82,) y las menores respuestas para los toros 3 y 5 (42.86±4.36 y 50.00±3.52) (Tabla 122).

Tabla 122. Porcentajes de los promedios de fertilidad *in vivo* en los toros criollos San Martinero

TORO	1	2	3	4	5	6	7
FERTILIDAD <i>in vivo</i> (%) ± DS	61.90±6.53	67.86±4.82	42.86±4.36	70.00±7.62	50.00±3.52	72.22±6.85	56.25±4.96

Por último podemos considerar que los toros de mejor promedio en términos de calidad espermática integrando las variables evaluadas en espermatozoides de semen fresco, post-descongelado, fertilidad *in vitro*, producción de blastocistos y fertilidad *in vivo* son los toros 2, 4 y 6 y los de menor promedio son los toros 3 y 5 sin ser considerados de baja eficiencia (Tabla 123).

Tabla 123. Posiciones de los toros para los criterios evaluados

Clasificación Puesto	Posición de Toros Mayor promedio			Posición de Toros Menor promedio	
	1	2	3	6	7
ICE Semen fresco (concentración, motilidad, viabilidad y morfología)	4	2	7	1	5
n°pajillas congeladas	4	2	6	3	5
ICE Semen post-descongelado (motilidad viabilidad y morfología)	6	2	4	3	7
Fertilidad <i>in vitro</i> (2PN)	6	2	3	4	7
Producción Blastocistos	6	2	4	3	5
Fertilidad <i>in vivo</i>	6	4	2	3	5

ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

En este sentido cuando realizamos una prueba de comparación entre los seleccionados del comportamiento de la concentración de proteínas mediante el procedimiento GLM de SAS (tabla 124), los resultados muestran lo siguiente:

Tabla 124. Niveles de asociación entre la concentración de los puntos de proteína y los toros seleccionados de la raza San Martinero con mejor y menor promedio.

Proteína	Pr>F	r ²	Mayor y menor promedio de concentración de proteínas.	Orden del nivel de concentración proteica de los toros seleccionados
A2001	0.4917	0.1223	Menor>	2. 3. 6. 5.
A3011	0.5724	0.1143	Menor<	5. 3. 6. 2.
A5101	0.3287	0.1884	Menor<	5. 6. 3. 2.
A5006	0.6399	0.1099	Mayor>	6. 3. 5. 2.
A4106	0.3380	0.1754	Mayor>	6. 3. 2. 5.
A4113	0.4493	0.1484	Menor<	2. 3. 5. 6.
A4119	0.4142	0.1364	Menor<	3. 5. 2. 6.
A3218	0.0368	0.3397	Mayor<	3. 2. 6. 5.
A2301	0.2408	0.1854	Mayor>	2. 5. 3. 6.
A7304	0.9904	0.0060	Menor<	5. 2. 6. 3.
A6307	0.6347	0.1046	Menor<	5. 6. 3. 2.
A1407	0.0260	0.4507	Mayor>	6. 3. 5. 2.
A507	0.3013	0.1887	Mayor>	6. 3. 5. 2.

La concentración del punto de proteína A3218 (mayor concentración) estaría relacionada principalmente con los toros de menor promedio, pero el análisis de asociación que señala es verdaderamente muy bajo ($r=0.34$; $p<0.05$) y el punto de proteína A1407 estaría asociado con los toros que mostraron mejor promedio pero igualmente su asociación estaría por debajo del 50% ($r=0.45$; $p<0.05$). En términos generales no se definen en forma concreta proteínas que expliquen específicamente la diferencia entre los toros San Martinero, no existe el orden lógico esperado (mayores y menores promedios). Es posible que este resultado sea debido a la poca variación de eficiencia reproductiva de los sementales de esta raza.

VI.3.3.4. Comportamiento de las proteínas respecto a los dos mejores y a los dos peores machos entre razas

Cuando la comparación se realiza más drásticamente entre los dos mejores toros San Martinero 2 y 6 vs los dos toros de menor promedio dentro de la raza Cebú 33 y 7 (Tabla 125 y 126) para realizar entre ellos la comparación del comportamiento de las proteínas mediante el procedimiento GLM de SAS, los resultados muestran lo siguiente:

Tabla 125. Niveles de asociación entre las concentraciones de proteína y los toros seleccionados como de mayor promedio de la raza Sanmartinero y los de menor promedio de la raza Cebú.

Proteína	Pr>F	R ²	Mayor y menor promedio de concentración de proteínas.	Orden del nivel de concentración proteica de los toros
A2001	0.6996	0.1738	Menores	33. 7. 2. 6.
A5101	0.7858	0.1180	Mayores	6. 7. 2. 33
A4113	0.0010	0.8909	Menores	37. 33. 6. 2
A4119	0.0099	0.7409	Menores	7. 33. 6. 2
A3218	0.6093	0.1940	Mayores	2. 33. 6. 7
A2301	0.0392	0.6287	Mayores	2. 6. 33. 7
A6310	0.1256	0.4924	Menores	7. 2. 33. 6
A409	0.3448	0.4025	Menores	6. 7. 33. 2
A1407	0.0423	0.6515	Menores	6. 33. 2. 7
A507	0.1667	0.8003	Mayores	6. 33. 7. 2
A4704	0.3468	0.5264	Menores	33. 7. 6. 2

Un orden lógico esperado para el punto de proteína A2301 de peso molecular 16.24 kDa y punto isoeléctrico 4.78 con cambios significativos ($p < 0.05$) y que está asociado con los toros de mayor promedio de las variables de eficiencia reproductiva, estaría definido como una posible BSP-A1 identificada en toros con buena fertilidad (Moura *et al.*, 2007).

Por otra parte, se observan los puntos de proteína A4113 de peso molecular 15.37 kDa y punto Isoeléctrico 5.38 y el punto de proteína A4119 con peso molecular de 15.46 kDa y punto Isoeléctrico de 5.15 asociados a los toros de menor promedio de las variables que estiman la eficiencia reproductiva.

Estos resultados son interpretados cuando comparamos estos niveles de fertilidad (de mayor y menor promedio) obtenidos a nivel general entre las dos razas. Por otra parte no quiere decir que estas proteínas sean o no sean las que identifiquen verdadera fertilidad a nivel general, si no que son respuestas que hay que visualizarlas dentro de la raza, es así que en el caso del punto de proteína A4119 a nivel general del Cebú es la proteína que más se expresa (Tabla 125).

Resultados

Tabla 126. Promedios de variables de calidad espermática de semen fresco, post-descongelado, fertilidad y producción de blastocistos del ganado Cebú

RAZA	CEBÚ	CEBÚ	CEBÚ	CEBÚ	CEBÚ	CEBÚ	CEBÚ
TORO	2	5	3	7	4	6	1
N° ANIMAL	13	21	16	38	20	33	7
VOLUMEN (ml) ±DS	9.17±2.52	5.33±1.61	7.00±1.00	5.50±1.32	6.33±0.58	5.33±3.01	5.67±2.93
CONCENTRACIÓN x 10 ⁶ ± DS	686.67±217.33	593.33±259.68	723.33±66.58	739.67±250.36	730.33±122.52	664.00±264.82	604.67±224.71
MOTILIDAD (%)± DS	73.33±5.77	78.33±2.89	79.33±1.15	83.33±2.89	75.00±5.00	81.67±2.89	78.33±5.77
VIABILIDAD (%)± DS	71.67±1.53	69.33±1.15	76.00±1.73	78.00±2.65	74.00±3.46	78.00±3.00	73.33±4.93
EPZ Normales (%)± DS	81.00±1.00	82.00±2.65	81.33±0.58	83.00±1.00	82.33±3.21	83.00±2.00	81.67±3.79
ICE ± DS	0.29±0.08	0.26±0.11	0.35±0.04	0.40±0.13	0.33±0.06	0.35±0.12	0.28±0.07

ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

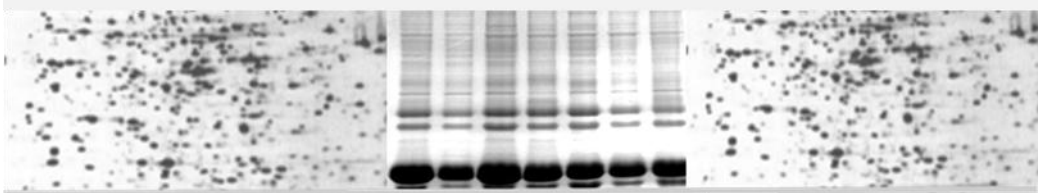
N °PAJILLAS CG ± DS	91.94± 41.58	50.57± 30.04	82.32± 9.58	76.26± 37.03	74.31± 20.32	64.45± 40.27	54.72± 45.39
---------------------	--------------	--------------	-------------	--------------	--------------	--------------	--------------

MOT PROG INDIV (%) ± DS	32.00±2.74	41.00± 2.65	39.20±6.22	38.60±4.16	33.40±4.22	33.0±2.12	32.40±2.51
VIABILIDAD (%) ± DS	55.60±1.14	56.60±3.05	53.40±3.29	57.80±3.83	56.20±1.64	50.00±4.30	41.20±2.77
EPZ NORMAL (%) ± DS	79.80±2.39	81.60±2.88	81.20±1.48	79.60±3.05	79.20±2.77	79.20±1.48	75.60±3.65
ICE PDC ± DS	0.14± 0.03	0.19± 0,02	0.17± 0,04	0.18± 0,01	0.15± 0,01	0.13± 0,02	0.10± 0,01

ICE Variable integradora de indicadores de calidad espermática

FERTILIDAD <i>in vitro</i> (%) ± DS	52.89±10.62	60.89±12.43	63.78± 5.86	60.44± 8.11	55.78±13.84	54.72±5.16	57.13± 2.65
BLASTOCISTOS (%) ± DS	22.22 7.64	36.18 5.75	23.06 5.53	27.52 11.27	22.77 4.31	17.37 5.29	18.35 7.09

VII. DISCUSIÓN



VII.DISCUSIÓN

VII.1 COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN FRESCO, ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO. COMPARACIONES ENTRE ÉPOCAS SECA Y LLUVIOSA Y CON LA RAZA CEBÚ BRAHMAN VISTAS DESDE EL ANÁLISIS DE LECTURA ELECTROFORÉTICA EN UNA DIMENSIÓN.

Para las evaluaciones de comportamiento de las variables de calidad espermática y participación de las proteínas del plasma seminal entre las épocas definidas para comparación (lluviosa y seca), es importante destacar que la variable climática integradora de la temperatura y humedad definida como índice de temperatura-humedad (ITH) entre ambas épocas, está por encima de los rangos reportados como normales, que son 70 o menos para la especie bovina (du Preez *et al.*, 1990). Por lo tanto, los resultados obtenidos estarían clasificados como de alerta al límite crítico de producción para la época lluviosa (71.0) y de alerta por encima del límite crítico para la época seca (79.1). Aunque estos rangos no se ajustan a nuestro medio y se requiere de un ajuste bajo las condiciones del trópico colombiano, lo que sí es cierto es que las dos épocas están bien diferenciadas en cuanto a variables climáticas.

Por otra parte, es conveniente resaltar que la raza comparativa seleccionada, Cebú Brahman, es una de las razas que más se ha adaptado a las condiciones del trópico bajo colombiano y es la que actualmente se explota con mayor intensidad (Fedegan, 2010).

VII.1.1. Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero comparadas con el Cebú Brahman vistas desde el análisis de lectura electroforética en una dimensión.

Los resultados de la presente investigación evidencian que las proteínas de bajo peso molecular (<30kDa) presentan las mayores concentraciones (cerca del 70%) en ambas razas evaluadas. En este perfil electroforético se pueden apreciar proteínas que posiblemente tienen que ver con la calidad espermática.

Aquí se podría encontrar la familia de las BSP, las espermadhesinas, la proteína ácida del plasma seminal aSFP y la TIMP2, inhibidor tisular de metaloproteinasa, entre otras (Killian *et al.*, 1993, Manjunath *et al.*, 1993, 1994a, 2007, Moura *et al.*, 2007, Barajas *et al.*, 2009). En el perfil proteico, se pueden apreciar las proteínas de peso molecular entre 30 y 60 kDa, en las que se podría encontrar la clusterina (Moura *et al.*, 2007a, Ibrahim 1999) y la osteopontina (Erikson *et al.*, 2007), lo que significaría que las proteínas de mayor relevancia en el tema de la fertilidad y, más específicamente, en la calidad espermática, estarían en el grupo de las proteínas de bajo peso molecular, uniéndose a ellas la clusterina y la osteopontina que estarían en el grupo entre 30 y 60 kDa.

Se resalta la presencia de dos bandas de proteínas más en el ganado Sanmartinero que no aparecen en el Cebú (19.9 kDa y 72.8 kDa) y que podrían estar explicando diferencias propias de la raza, posiblemente relacionadas con la fertilidad. Sin embargo, el total de la proteína expuesta del plasma seminal es similar entre razas, al igual que las bandas de mayor concentración, pero en el análisis de bandas en forma puntual destaca la diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) de tres bandas de proteínas de peso molecular 5.4, 61.1 y 66 kDa, cuyas concentraciones son superiores en Cebú ($p < 0.05$). Al menos una de estas bandas podría estar relacionada con proteínas como la caltrina o plasmina seminal, de bajo peso molecular, que tiene acciones inhibiendo la actividad de la acrosina en la exocitosis (Winnica *et al.*, 2000) y que a nivel del epidídimo, contribuyendo a la inhibición del calcio por parte de los espermatozoides, ha sido considerada como factor de antifertilidad (Killian *et al.*, 1993, Randolph *et al.*, 1985). Esto sugiere que encontrarla en el plasma seminal indicaría que posee un efecto inhibitorio en los procesos de reacción acrosómica, capacitación espermática y de penetración de la zona pelúcida, por lo que podría ser una proteína moduladora y controladora de la polispermia. Por otra parte, las proteínas de 61 y 66 kDa, que están directamente asociadas con toros de alta fertilidad (Killian *et al.*, 1993, Moura *et al.*, 2005, 2006, 2207, Erikson *et al.*, 2007, Souza *et al.*, 2008) y de gran facilidad de congelación (Jobim *et al.*, 2004, 2009). Podrían estar relacionadas con la osteopontina. La banda de proteína de peso molecular de 45 kDa no varió estadísticamente entre las dos razas ($p > 0.05$), y podría tratarse de la clusterina, proteína que forma parte del fluido epididimal y del plasma seminal con funciones de prevención hacia el daño por estrés oxidativo en el espermatozoide (Reyes *et al.*, 2002, Moura *et al.*, 2007b); además, parece estar involucrada en el proceso de espermatogénesis, previniendo la lisis celular y mediando la distribución de lípidos a través de membrana espermática (Ibrahim 1999).

Sin embargo, se ha reportado que ciertos niveles en el semen del toro y sementales (Novak *et al.*, 2010) son indicativos de semen de baja calidad, ya que aglutina espermatozoides anormales (Ibrahim *et al.*, 2000, Jobim *et al.*, 2009).

Las bandas de proteínas de 29, 36 y 33.3 kDa correlacionaron con la concentración espermática. La proteína de 33.3 kDa se asoció inversamente con motilidad y viabilidad espermáticas. Como se planteó en los resultados, esta banda de proteínas posiblemente puede tener una doble función en toros Cebú, por un lado actuar como un factor antimotilidad y por otro lado actuar como un factor de capacitación del espermatozoide como lo explican Moura *et al.*, (2006a). Estas bandas de proteínas, 29.36, 36 y 33.3 podrían estar relacionadas con la BSP 30 kDa que actúa en la capacitación espermática (Moura *et al.*, 2006a). La banda de 24 kDa, similar en ambas razas ($p > 0.05$), podría estar alojando las TIMP-2, proteínas presentes en las glándulas accesorias y no en fluido epididimal que tienen que ver con la membrana espermática y la unión de gametos (Moura *et al.*, 2007b).

Finalmente, en esta comparación entre razas es de resaltar la alta concentración tanto en San Martinero como en Cebú, de la banda de proteína de 14.02 kDa. En esta banda de proteína

podrían considerarse la BSP-A1/A2 y BSP A3, la espermadhesina y la proteína acida del fluido seminal (aSFP).

Una posición importante bajo este punto de vista de análisis de lectura 1D es que se definen bandas de proteínas propias para cada raza en este estudio. Es así que las bandas de proteína de 72.8 y 19.9 kDa se observaron en la raza San Martinero y la banda de proteína de peso molecular de 36 kDa se observó en la raza Cebú Brahman; esto en principio serían indicadores diferenciales, al igual que las concentraciones de las bandas de proteína de 5.4, 61.1 y 66.0 kDa, que fueron superiores en ganado Cebú ($p < 0.05$) y las asociaciones de la proteína 33.3 en forma inversa con viabilidad y motilidad espermática, y directa con concentración espermática, junto a las bandas de 29.0 y 36 kDa. Estos cambios podrían estar explicando la actividad de estas proteínas en el comportamiento reproductivo de cada raza.

VII.1.2 Proteínas del plasma seminal del ganado San Martinero en época lluviosa comparadas con la época seca, vista desde el análisis de lectura electroforética en una dimensión.

El efecto del medio ambiente climático adverso se traduce en cambios que afectan la eficiencia productiva en los animales, y en especial la calidad espermática (Velásquez *et al.*, 1998b).

Estos cambios son la respuesta, en parte, a las modificaciones o ajustes en el perfil de proteínas del plasma seminal. El presente estudio muestra bandas de proteína de peso molecular 17.1, 20.1 y 36 kDa que aparecen en la temporada de menor precipitación, que como se explicó en los resultados, pueden ser la respuesta a estos ambientes adversos que permite proteger al espermatozoide ante el estrés oxidativo provocado por las altas temperaturas, como lo señalan Pérez-Crespo *et al.*, (2008). Estas bandas de proteína podrían estar asociadas con las llamadas HSP, o proteínas del shock calórico (Baraja-Vázquez *et al.*, 2005).

La banda de proteína de 45 kDa muestra una disminución ($p < 0.05$) tanto en su concentración como en su frecuencia de presentación en la época seca. La banda de 45 kDa posiblemente contenga a la clusterina, proveniente de las glándulas sexuales accesorias, y reconocida como importante para la funcionalidad de la célula espermática (Moura *et al.*, 2007a). A pesar de este resultado, no es posible afirmar que la proteína decrece o desaparece, debido a que en esta banda podrían estar presentes otras proteínas. En este sentido, si se considera que la clusterina está relacionada con la motilidad del espermatozoide, ésta podría ser la explicación de su descenso en la época seca. Es probable que esta proteína pueda estar relacionada con las proteínas del shock calórico.

De otra parte, la banda de 19.9 kDa aumenta su frecuencia en la época seca y se asocia en forma significativa con la motilidad ($r = 0.76$ $p > 0.05$). Al igual que en el caso anterior, en esta banda podrían incluirse proteínas que tengan algún efecto de protección al espermatozoide para que

su fertilidad no se vea tan influenciada por la variación climática. En este sentido, es posible que el incremento en la concentración de esta banda pueda explicar el porqué la motilidad no se afecta en el ganado Sanmartinero en función de la época. Así mismo, es posible que en estas bandas puedan estar incluidos puntos de proteínas de unión a heparina (HBPs), que están relacionadas con altas tasas de reacción acrosómica, capacitación (Gwathmey *et al.*, 2003), y con toros de alta fertilidad (Moura *et al.*, 2006a, McCauley *et al.*, 2004).

VII.2. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN FRESCO ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO. COMPARACIONES ENTRE ÉPOCAS LLUVIOSA Y SECA Y CON LA RAZA CEBÚ BRAHMAN VISTAS DESDE EL ANÁLISIS DE LECTURA ELECTROFORÉTICA EN DOS DIMENSIONES.

En este apartado, el análisis de la información se realiza desde un panorama general, considerando este panorama a todos los puntos de proteína captados en los geles por raza y por época analizados en forma puntual y comparativa con la calidad espermática (Tabla 18 y 20). Comprobar que los números de las tablas son correctos.

VII.2.1. Panorama General y comportamiento puntual de los puntos de proteína

Los registros generados por el software PD-Quest para el mapa referencial electroforético de puntos de proteína del plasma seminal del ganado criollo San Martinero y Cebú en el periodo de inicio de la etapa reproductiva son la primera referencia a nivel nacional. En el mapa se visualizan 64 puntos de proteína, 27 más que en el Cebú Brahmán, con puntos isoeléctricos entre 3.59 y 9.8 la gran mayoría. Tanto para la raza San Martinero como para la Cebú (95%) son puntos de proteína ácidos o ligeramente ácidos. Como se anota en lo expuesto en el apartado de resultados, el pI de los puntos de proteína encontrados en el plasma seminal de los toros es similar al encontrado por Roncoletta *et al.* (2006). En este análisis de todos los puntos de proteína reflejados en el mapa electroforético del ganado Sanmartinero en las dos épocas, lluviosa y seca, se evidencian puntos propios para cada época o presentes para las dos épocas. Esto explica que existe un mecanismo de respuesta del ganado Sanmartinero por efecto de la variación climática y de la misma forma para cada raza, lo que expresa la identidad del ganado criollo Sanmartinero y el Cebú.

La información obtenida en la electroforesis 1D y los registros de puntos de proteína obtenidos en 2D, señalan a las proteínas codificadas como A2301 y A3218 de pesos moleculares y puntos isoeléctricos 16.74 kDa; 4.78 y 16.24kDa; 4.94, respectivamente, como los de mayor porcentaje de presentación y concentración en Sanmartinero, que pueden corresponder a las BSP-A1/A2 (Pesos moleculares entre 15 y 16.5 KDa; pls entre 4.7 y 5.2), y por su ubicación, el punto A2001 (peso molecular 14.02 kDa y punto isoeléctrico 4.81) como una BSP-A3 similar a lo reportado en los trabajos de Manjunath *et al.* (1987, 1993b, 2009) y Gwathmey *et al.* (2003, 2006), Jois *et al.* (2010), Lafleur *et al.* (2010) y Naunc *et al.* (2000). Es importante resaltar que dentro de los puntos de proteínas de mayor concentración se refleja la A4119, y que podríamos estar hablando, por su posición, de una isoforma de las BSP. Así

mismo, la ubicación del punto A1411 y posiblemente el A1407 y A507 sobre el gel, con valores de peso molecular y pI de 28.20 kDa y 4.30; 28.62 y 4.02; 28.74 y 3.87, respectivamente, pueden indicar que se trata de la BSP-30kDa (28 kDa, pI 3.9-4.6) reportada en los trabajos de los mismos investigadores y de Desnoyers *et al.*, estos últimos en 1992, y de Moura *et al.*, (2006a).

Estos investigadores señalaron que la concentración de las BSP-A1/A2 y A3, correspondía al 41% del total de las proteínas del plasma seminal, resultado similar al encontrado en este trabajo (40.5%) al sumar los valores de concentración de las proteínas. Las BSP-A1, BSP-A2, BSP- A3 y las BSP-30 kDa son las principales proteínas del plasma seminal bovino reportadas; son, como ya se ha comentado, secretadas por las vesículas seminales (Manjunath *et al.*, 1984, 1987). Las proteínas que forman parte del plasma seminal (BSP), y que provienen de las glándulas sexuales accesorias intervienen de diversas formas en el funcionamiento del espermatozoide (Moura *et al.*, 2007). Algunas de ellas participan en la capacitación del espermatozoide, tal es el caso de las proteínas seminales bovinas BSP A1/A2, -A3 y las BSP 30 kDa, las cuales inducen la salida del colesterol de la membrana del espermatozoide (Manjunath y Therien 2002); además, las BSP A1/A2 se unen a las células epiteliales del oviducto y contribuyen a la formación de reservorios espermáticos (Gwathmey *et al.*, 2003).

De otro lado, se ha sugerido que las BSP pueden, en una fase inicial, estabilizar la membrana del espermatozoide, es decir actuar como factor decapacitante y prevenir de esta forma una prematura reacción acrosómica. En una fase siguiente, podrían participar en las modificaciones necesarias de la membrana para que se efectúe la reacción del acrosoma (Desnoyers y Manjunath, 1992, Desnoyers *et al.*, 1994, Manjunath *et al.*, 1994b, 2002, Thérien *et al.*, 1997, 1998, 1999).

VII.2.2. Evaluación comparativa de las proteínas del plasma seminal detectadas en ganado criollo San Martinero en la época lluviosa y en la época seca. Panorama general.

Como se anotó anteriormente, es muy probable que el punto con número de codificación A2301 corresponda o forme parte de las BSP-A1/A2, las cuales juegan un papel importante en diferentes etapas del proceso de fecundación. De esta forma, es posible sugerir que la baja concentración de esta proteína durante la época seca podría explicar en un momento dado, la disminución en los porcentajes de fertilidad que puedan presentar los toros de la raza durante la misma.

De otra parte, el incremento en la concentración de los puntos de proteínas A3011 y A4119 en la época seca, y la correlación positiva que evidencia el punto de proteína A3011 ($p < 0.001$, $r = 0.67$), con la concentración de espermatozoides del eyaculado y la proteína A4119 ($p < 0.001$, $r = 0.51$)

Con el porcentaje de espermatozoides viables, sugieren que posiblemente estas dos proteínas jueguen un papel importante en el funcionamiento del espermatozoide durante este periodo climático. En cuanto al punto de proteína A3011, podríamos asociarla con la proteína ácida del fluido seminal (aSFP) por sus similitudes en posición, punto isoeléctrico y aproximaciones del peso molecular del mapa referencial (Moura *et al.*, 2007a) y los reportados por las bases de datos NCBI NR. Esta proteína es secretada por las vesículas seminales, ámpulas y epidídimo, más no por el testículo. Muestra poder de preservación de la membrana espermática por poseer un efecto antioxidante sobre la peroxidación lipídica de la misma, presenta un efecto dosis dependiente y altos niveles de proteína actúan inversamente con la motilidad. Esta respuesta es similar a la obtenida en este estudio con respecto a la motilidad y constataría los datos previamente aportados.

El punto de proteína A7001, de peso molecular 13.94 y punto isoeléctrico 6.15, podría corresponder a una espermadhesina. Esta proteína presenta una relación inversa con la fertilidad y altera la motilidad espermática (Moura *et al.*, 2006b, Jobim *et al.*, 2009, Tedeshi *et al.*, 2000). En este estudio no se evidencia diferencia estadística entre épocas, respuesta que explica que en el ganado bovino criollo Sanmartinero, la época seca no afecte su comportamiento reproductivo.

Con respecto a los puntos de proteína A1411, A1407 y A507, con pesos moleculares y puntos isoeléctricos de 28.20 y 4.30; 28.62 y 4.02; 28.74 y 3.87, que podrían corresponder a la BSP-30kDa (Kelly *et al.*, 2006, Moura *et al.*, 2007), evidencian un mayor porcentaje de concentración y una frecuencia de presentación mayor en el plasma seminal de los toros en la época de lluvias, que se resalta especialmente en la proteína A1411 ($p < 0.001$). Esta observación propone la importancia que tiene esta proteína en el proceso de fecundación durante la época de lluvias, y su baja frecuencia de presentación en la época seca sugeriría la razón de la posible caída en los índices de fertilidad del toro en estas condiciones. Es posible entonces que las altas temperaturas que caracterizan la época seca depriman la producción de la proteína a nivel de vesículas seminales. Sin embargo, al analizar la proteína codificada como A1507 de peso molecular 29.48 y punto isoeléctrico 4.77, muy similar a la BSP-30kDa, se observa una condición inversa a las proteínas A1411, A1407 y A507. En esta proteína la frecuencia es mayor en la época seca con respecto a la lluviosa ($p < 0.001$), lo que sugeriría que esta proteína podría estar actuando como moduladora del proceso.

La presencia o ausencia de puntos de proteína de plasma seminal, así como su frecuencia, en la época lluviosa o seca podrían sugerir que existe un efecto marcado de la época climática sobre las características de este fluido en el ganado criollo San Martinero. Es de resaltar el hecho de que la mayoría de las proteínas se expresen en la época de lluvias, lo cual sugiere la posibilidad de que jueguen un papel importante en el adecuado funcionamiento del espermatozoide, y es posible que puedan estar relacionadas con el proceso de fecundación. En este sentido, se puede observar que las proteínas A2703 y A3608, con pesos moleculares en kDa y puntos isoeléctricos 38.55 y 5.53, y 38.71 y 4.89,

respectivamente, se presentaron en las dos razas, con menor concentración en San Martinero en la época lluviosa, y la serie A4609, A4608, A5605, A4611, y A6601, con pesos moleculares en kDa y puntos isoelectricos 38.73 y 4.96, 38.81 y 5.32, 39.08 y 5.69, 39.32 y 5.38, y 39.88 y 5.91, respectivamente, no se presentaron en la época seca ni en la raza Cebú pero sí en la época lluviosa. Por su ubicación, estos puntos de proteínas podrían corresponder a clusterina, la cual es secretada por las células epiteliales del epidídimo y tiene como función contribuir a la maduración espermática (Ibrahim *et al.*, 2000), previene el daño causado por estrés oxidativo en el espermatozoide y parece estar involucrada en el proceso de la espermatogénesis (Reyes-Moreno *et al.*, 2012). Se ha observado también su efecto protector sobre la membrana espermática durante la criopreservación (Jobim *et al.*, 2009), y su presencia en el semen del toro se ha considerado como un marcador potencial de baja calidad (Ibrahim *et al.*, 2001a). Esta información sugiere que la presencia de las proteínas A2703 y 3608 en los toros Sanmartinero y Cebú estaría explicando en parte las diferencias en calidad seminal de las dos razas; sin embargo, la no presencia de ninguna de las proteínas citadas en la época seca, al igual que las no presentes en el toro Cebú, nos hace suponer que las concentraciones halladas en la época lluviosa del Sanmartinero no son lo suficientemente altas como para generar un efecto negativo sobre la calidad espermática.

Por otra parte, la presencia de puntos de proteínas que se expresan en un mayor número de veces en la época seca sugiere la posibilidad de que sean proteínas relacionadas con el shock calórico y podrían tener como fin proteger la integridad de la membrana del espermatozoide de los efectos de las altas temperaturas.

Al analizar la proteína codificada como A5703 de peso molecular 65.29 y punto isoelectrico 5.86, que se encontró un mayor número de veces en la época lluviosa pero con una frecuencia de presentación media, se observa una correlación negativa ($p < 0.05$, $r = -0.39$) con el porcentaje de espermatozoides móviles y con el porcentaje de espermatozoides viables.

El bajo porcentaje de correlación permite sugerir la posibilidad de que su función sea la de mantener los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática dentro de los rangos normales. Podría entonces inferirse para esta proteína la posibilidad de que ejerza una doble función en el espermatozoide, por un lado actuar como un factor de antimotilidad y por el otro como un factor de capacitación del espermatozoide

VII.2.3. Evaluación comparativa del toro criollo San Martinero con la raza Cebú Brahman, panorama general.

El mapa referencial 2D-PAGE de las proteínas del plasma seminal del ganado Cebú Brahman, evidencia la presencia de 37 puntos de proteína con pesos moleculares entre 13.9 y 66.2 kDa y puntos Isoelectricos entre 4.0 y 9.8. El 94.44% de los puntos tienen un pH ácido

o ligeramente ácido, similar a lo descrito en la raza Sanmartinero (95%) y a lo que reportan Roncoletta y Da Silva (2006).

Los puntos de proteína A3218 y A2301 detectados en el gel, al igual que en el San Martinero, posiblemente correspondan a las BSP –A1/-A2 (PM entre 15 y 16 kDa; pls entre 4.7 y 5.2), y el punto de proteína A4119 (PM 15.46kDa, pl 5.15) a una posible isoforma de las BSP o a una nueva proteína que se podría estar expresando por las condiciones del trópico Colombiano. El punto de proteína A2001 registrado en el gel con peso molecular 14.02 kDa y pl 4.81 podría estar relacionado con una BSP-A3 (PM 15.0 kDa, pl 4.8 – 5.2) reportada en los trabajos de Manjuntah *et al.* (1987, 1993) y Gwathmey *et al.* (2003, 2006). De igual forma, los valores de peso molecular y pl 28.2 kDa, pl 4.3 que muestra el punto A1411, como se dijo anteriormente, sugieren que puede tratarse de la BSP–30kDa (28 kDa, pl 3.9, –, 4.6) reportada en los trabajos de los mismos investigadores y de Desnoyers *et al.*, estos últimos en 1994.

Se conoce que la suma de las concentraciones de las BSP A1/A2 y A3 corresponde al 41%, del total de las proteínas del plasma seminal. En este estudio, la sumatoria de las concentraciones de las proteínas propuestas como BSP A1/A2 y A3 para la raza Cebú Brahman fue de 28.13%, inferior al reportado en los trabajos de los investigadores referenciados y al obtenido en el ganado criollo San Martinero (40.05%). Sin embargo, cuando incluimos en esta sumatoria el punto de proteína A4119 como isoforma de las BSP, los valores se acercan más entre las dos razas (46.714 vs 43.640) siendo todavía un poco menor en Cebú. Al analizar las proporciones de las BSP A3 vs. A1/A2 se observa que son mayores en el Cebú que en el San Martinero, representando un 20 y 10%, respectivamente. La razón, en primer lugar, de la diferencia de las concentraciones, posiblemente radica en que

los reportes se realizaron en un tipo de raza europea como la Holstein Friesian y en otras condiciones ambientales (Mortarino *et al.*, 1998). Por otra parte, para este estudio, las diferencias en concentración y proporción podrían explicar el mejor comportamiento de las variables de calidad espermática del bovino San Martinero, si consideramos que las BSP A1 y A2 (PDC 109) están relacionadas con la motilidad (Moura *et al.*, 2007a) y, junto a la BSPA3, se unen fácilmente a la membrana espermática (Mortarino *et al.*, 1988) contribuyendo en los procesos de capacitación. La BSPA3 contribuye, además, a la PDC-109 en la preservación de la fertilidad del semen de toro, cuando los espermatozoides están almacenados en el oviducto; sin embargo, cuando sus concentraciones son altas más de 2.5 veces, su presencia se asocia con toros de baja fertilidad (Roncoletta *et al.*, 2006 y Jobim *et al.*, 2009).

De los análisis de los puntos de proteínas que demuestran alguna asociación, cabe destacar el alto valor de correlación inversa ($r=-0.69$) mostrado por el punto de proteína A4113 con peso molecular y punto isoeléctrico 15.37 y 5.38, y su grado de significancia estadística ($p<0.001$) con la concentración espermática en Cebú, lo cual sugiere la posibilidad de que pueda desempeñar un papel importante en el control de la producción de espermatozoides por el testículo en la raza o señalar un aspecto negativo.

De otra parte, llama la atención la correlación, aunque baja, entre la proteína A2001 y la concentración espermática en la raza San Martinero ($r = -0.35$; $p < 0.05$). Este punto puede corresponder con la BSP-A3 reportada en los trabajos de Manjunath *et al.* (1987, 1993b). Gwathmey *et al.* (2003, 2006), en sus investigaciones no reportan que la proteína tenga efecto sobre esta variable; además, es de anotar que la concentración proteica de la A2001 es menor en San Martinero que en Cebú.

Contrario a la situación anterior, se evidenció una correlación positiva de la proteína A2301 con la concentración de espermatozoides del eyaculado ($r = 0.48$ $p < 0.05$) en toros Cebú. Como se dijo anteriormente, el peso molecular y el pl de esta proteína concuerdan con los valores de las BSP-A1/A2 reportadas en los trabajos de Manjunath y Sairam en 1987, y Gwathmey *et al.* (2003, 2006). Sin embargo, no se conoce función alguna de estas proteínas sobre la concentración de espermatozoides del eyaculado. Es de resaltar que aunque no se encontró correlación alguna en Sanmartinero, se evidenció mayor concentración en esta raza.

En el toro San Martinero la concentración espermática presenta una alta correlación con la proteína A3011 en forma altamente significativa ($p < 0.001$; $r = 0.67$). Es de resaltar que esta proteína no se presentó en la raza Cebú, y por su ubicación estaría asociada con la aSFP, que tiene una acción más de protección espermática (Schoneck *et al.*, 1986).

En 1993, Calvete y Eispánier sugirieron que esta proteína podría ser un nuevo factor de crecimiento lo cual podría explicar su relación con la concentración espermática. Los resultados sugieren a la proteína como una característica propia del San Martinero que estaría asociada a una mayor concentración espermática.

El punto de proteína A7001 de peso molecular 13.94 y punto isoeléctrico 6.15 podría corresponder a una espermadhesina. Esta proteína presenta una relación inversa con la fertilidad y altera la motilidad espermática (Killian *et al.*, 1993 y Moura *et al.*, 2006b). En este estudio, se observó que su concentración fue mayor en la raza Cebú Brahman que en San Martinero. Es posible que la presencia en menor concentración de esta proteína en la raza San Martinero indique un menor efecto sobre la calidad espermática.

El hecho de encontrar proteínas del plasma seminal que ejercen efectos positivos o negativos sobre la concentración de espermatozoides del eyaculado evidencia acciones encontradas de estas proteínas, probablemente con el fin de mantener la producción de espermatozoides por parte del testículo, dentro de rangos normales.

En la raza Cebú, los puntos de proteína A409 y el punto A4113 correlacionaron negativamente con el porcentaje de espermatozoides móviles del eyaculado, sugiriendo la posibilidad de que estas proteínas del plasma seminal estén ejerciendo una función de anti motilidad, con el fin posiblemente de permitir que el espermatozoide conserve la energía necesaria para su viaje por el tracto genital femenino en su camino al encuentro con el ovocito, o manifestando un efecto negativo propio de los toros. En el toro San Martinero no se

encontraron este tipo de correlaciones. Sin embargo, sí se presentaron asociaciones entre viabilidad y el punto de proteína A4119 en forma altamente significativa ($p < 0.001$ $r = 0.51$), y con la proteína A5703 (PM 65.29 y 5.86) en forma significativa ($p < 0.05$ $r = 0.39$). Esta última proteína presentó iguales resultados con la motilidad de espermatozoides. A pesar del bajo valor de correlación, existe la posibilidad de que su función sea la de mantener los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática dentro de los rangos normales. Podría entonces inferirse para esta proteína la posibilidad de que ejerza una doble función en el espermatozoide, por un lado actuar como un factor de antimotilidad y por el otro como un factor de capacitación del espermatozoide.

De otra parte cabe resaltar que de los puntos considerados posiblemente como proteína clusterina, A4609, A2703, A3608 y A6601, solamente dos se presentaron en la raza Cebú (puntos de proteína A2703 y A3608).

Esta respuesta nos puede estar indicando, como se planteó anteriormente, que los puntos de proteína A4609, A4608, A5605, A4611 y A6601, posiblemente estarían brindándole al espermatozoide del toro San Martinero alguna protección que lo hace de mejor calidad que el espermatozoide de la raza Cebú.

Como se ha comentado, en el toro San Martinero, los puntos de proteína considerados posiblemente como clusterinas fueron la A4609, A2703, A3608 y A6601 y para el Cebú la A2703 y A3608 con frecuencias de presentación bajas para las dos razas. Los resultados sugieren que la calidad espermática tanto en San Martinero como en Cebú no requiere de la acción de estas proteínas. Las clusterinas tienen que ver con la aglutinación de los espermatozoides anormales (Reyes.Moreno *et al.*, 2002).

La concentración de la proteína A4113 fue mayor en toros Cebú que en toros San Martinero (11.77% vs.1.62% respectivamente, $p < 0.001$). Como se referenció anteriormente, esta proteína se correlaciona negativamente con concentración y motilidad espermática del semen de toros Cebú. De igual forma, la concentración de la proteína A4119 fue mayor en el plasma seminal de toros de la raza Cebú que en toros de la raza San Martinero (15.512% vs.6.66%, respectivamente, $p < 0.001$). Esto sugiere de alguna forma que la diferencia de participación proteica y asociación estarían explicando la posible mejor eficiencia reproductiva del toro San Martinero y hace suponer que la proteína A4119 en concentraciones menores puede estar actuando en forma positiva con la calidad espermática como lo demuestran los resultados con viabilidad espermática descritos anteriormente en toros San Martinero. Por otra parte, no hay que desconocer la acción de antimotilidad de la A4113 que podría estar ejerciendo como control o como efecto que incida en la calidad espermática.

Las respuestas de estas dos proteínas de mayor concentración proteica en el Cebú estarían jugando un papel importante que podría estar explicando la asociación inversa de las variables tratadas en el apartado de resultados.

Un dato importante a resaltar es el hecho de que la concentración del punto de proteína A3218 (PM 16.24 y pl 4.94) tiene un mayor valor en toros San Martinero que en toros Cebú (17.1% vs. 13.4% respectivamente $p < 0.05$) al igual que la proteína A2301 (PM 16.74 y pl 4.78) presentó mayor valor en la raza San Martinero (19.220% vs. 8.72%, respectivamente, $p < 0.001$). Como se sugirió anteriormente, es posible que estas proteínas formen parte de las BSP-A1/-A2, que como se sabe son importantes en el proceso de fecundación (Souza *et al.*, 2008), por lo que se podría sugerir la posibilidad de que pudieran inferir positivamente sobre los índices de fertilidad de los toros de la raza San Martinero. La concentración del punto de proteína A2001, que también integra las BSP, no mostro diferencias significativas entre razas.

Con respecto a la proteína A7311, se observa una mayor concentración (4.1023.89 vs. 3.89), y una menor presentación (4 vs. 18) en toros Cebú que en toros San Martinero. Al respecto, es conveniente adelantar más estudios con el ánimo de encontrar la función que pueda ejercer esta proteína.

VII.2.4. Calidad espermática y su relación con cluster de proteínas del plasma seminal.

En este apartado el análisis que se realiza es de evaluación en grupos o cluster de proteínas del plasma seminal mediante diferentes tipos de modelos. Este tipo de análisis no ha sido reportado en la literatura consultada y permite con mejor precisión demostrar que la participación de las proteínas no es independiente.

VII.2.4.1. Volumen seminal.

ÉPOCA

El volumen seminal del toro San Martinero es afectado significativamente ($p < 0.001$) por la época seca (9.36 ± 1.97 vs. 6.12 ± 2.49 para la época lluviosa), respuesta similar a los trabajos reportados por Velásquez *et al.* (1999) en la misma raza y bajo las mismas condiciones. Este volumen es superior al reportado por Jiménez *et al.* (1996), 4.7 ml en la misma raza, posiblemente debido al uso de los nuevos equipos que permiten un mejor control de los impulsos o el del manejo animal y un mejor drenaje.

Los cambios en el volumen seminal obtenidos por efecto de la época no se explican en forma independiente, ni en la época de lluvias ni en la época seca, por acción de los puntos de proteína seleccionados. Sin embargo cuando el análisis se realiza en forma general, es clara la participación en forma significativa del grupo de puntos de proteína A2301 con peso molecular 16.74 kDa y punto isoeléctrico 4.78 en forma directa, y de A4113 en forma inversa (15.37 kDa y pl 5.38).

El punto de proteína A2301, como se anotaba anteriormente, probablemente se enmarca en las BSP y por su posición posiblemente podría ser una BSP- A1 (Kelly *et al.*,2006)., Cuando se visualiza a nivel de concentraciones por épocas, se evidencia una menor concentración de este punto de proteína en la época seca (11.840 vs.19.200), en forma altamente significativa ($p<0.001$) indicándonos una posible acción específica por efecto de la variación climática en estas proteínas, que podrían estar estimulando la producción de fluidos seminales.

El punto de proteína A4113, que marcó una gran asociación inversa con la concentración espermática en el modelo general, pero cuya concentración fue superior en la época seca, a diferencia de la A2301, nos hace suponer que este efecto inverso podría ser un efecto modulador de esta proteína. En este sentido, es posible que estas proteínas en forma grupal desempeñen un rol importante sobre el volumen seminal según la fórmula indicada.

Volumen seminal = $6.6864 - (A4113 * 0.99536) + (A2301 * 0.22223)$

A pesar de ello, hay que resaltar que en estos modelos no se deben ignorar los puntos de proteína que no fueron significativos (A4119, A507, A5006, A1407, A2001) ya que en algo están contribuyendo para determinar la fortaleza del modelo, puesto que la acción detectada es, como hemos dicho, grupal.

Por otra parte, hay que considerar que los cambios por efecto de la época están ligados a las diferencias obtenidas en temperatura y humedad relativa que se enmarcan en el índice de temperatura- humedad (ITH), y que estos resultados son similares a los reportados por Velásquez *et al.*,(2000).

RAZA

En la comparación del volumen seminal del toro San Martinero con la raza Cebú Brahman se observan diferencias significativas ($9,36\pm 1.97$ ml vs. $6.12 \pm 2,49$ ml), información similar a la obtenida por Obando (1999). Sin embargo, hay un efecto del muestreo ($p<0.05$), que aunque no es muy diferencial, marca diferencia estadística. Este comportamiento puede ser debido al mismo tipo de procedimiento o a factores fisiológicos de drenaje que alteran el volumen seminal. En términos generales se observa mejor eficiencia del ganado San Martinero que del Cebú, lo que explica cómo esta raza, a través de los años, ha sufrido cambios que hacen que sea eficiente bajo las condiciones del trópico bajo Colombiano.

Cuando se analizan los posibles puntos de proteína del plasma seminal que pudieran estar afectando el volumen seminal, vemos cómo a pesar de existir diferencia entre raza, en uno de los modelos, evaluados a nivel general, el punto de proteína A 4119 de peso molecular 15.46 kDa y punto isoeléctrico 5.15 marca diferencia significancia ($p<0.05$) sobre su comportamiento en forma inversa a pesar de la baja fortaleza en el modelo corrido ($R^2 = 0.49$) que nos limita en su capacidad de predicción sobre el volumen seminal. En este mismo sentido, a nivel general, cuando se evalúan las correlaciones parciales puntuales, observamos asociaciones

inversas en forma altamente significativa ($p < 0.001$) de los puntos de proteína A4113 (PM 15.37 y pl 5.38), con un coeficiente de correlación de $r = -0.57$, y A4119 (PM 15.46 y pl 5.15) con un coeficiente de correlación de $r = -0.54$, y el punto de proteína A2301 (PM 16.74 y pl 4.78) que presenta una asociación directa en forma significativa ($p < 0.05$; $r = 0.45$) con el volumen seminal.

A pesar de la baja fortaleza de los modelos a nivel general, estos puntos de proteína A4119 y A4113 presentan menores concentraciones en los toros San Martinero que en Cebú (6.664 vs.15.512 y 1.623 vs.11.774, respectivamente). A este punto de confianza, a nivel general y apoyándonos en los promedios de concentración proteica de cada punto de proteína en cada una de las razas, y en la repuesta obtenida de la producción de volumen seminal, podríamos suponer que la A4119 y A4113 con PM y pl muy cercanos, podrian estar jugando un papel importante a nivel de glándulas accesorias que permiten definir el volumen seminal. Por el contrario el punto de proteína A2301, con gran semejanza por su posición con una posible BSP-A1 (Kelly *et al.*, 2006), señala una concentración proteica superior en los toros San Martinero que en Cebú (19.200 vs.8.718), lo que nos indicaría que este punto de proteína estaría asociada en forma directa en el ganado San Martinero con la cantidad del volumen seminal. La acción posible de la BSP-A1 podría ser de estimulación de fluidos seminales a nivel de vesículas seminales.

El análisis por raza también señala para la San Martinero influencia directa del punto de proteína A4704 (PM 66.20 y pl 5.60) en forma significativa ($p < 0.05$). Cabe anotar que la fortaleza del modelo ($R^2 = 0.5$) limita la predicción de este punto de proteína sobre el volumen seminal. Sin embargo, cuando observamos sus concentraciones en forma comparativa con el Cebú, se observa que tiene valores menores (1.549 vs.2.846). Bajo estos términos podríamos decir que estas concentraciones de proteína pueden ser propios de cada raza o que su incremento influye sobre la producción del volumen seminal. Al revisar su posición podríamos suponer que se asemeja a una fosfolipasa A_2 (PLA-2), pero al revisar su actividad no la relacionan con el volumen seminal (Miller y Winer, 1990, Riffo *et al.*, 1997, Kelly *et al.*, 2006). Para la raza Cebú hemos detectado el punto de proteína A3218 (PM 16.24 y pl 4.94) con influencia inversa y significativa ($p < 0.05$) en el volumen seminal bajo un modelo de poca fortaleza ($Pr > F 0.026$ $R^2 = 0.43$), respuesta similar a la obtenida por correlaciones parciales. Este punto de proteína podría ser similar a una BSP A1-A2 por su posición reportada por Kelly *et al.* (2006). Esta respuesta y la de comportamiento en la época, hacen suponer que la participación de los puntos de proteína que expliquen el comportamiento del volumen espermático en el toro San Martinero y Cebú posiblemente estaría comprometiendo a las BSPA1-A2 pues no se encuentra diferencia entre sus concentraciones (17.250 vs.17.260). Esta participación debería ser analizada más a fondo, puesto que la literatura no reporta acciones similares.

En cuanto al punto de proteína A4704, que podría estar involucrada en el comportamiento del volumen seminal, su concentración es mayor en la Raza San Martinero que en la Cebú

(1.549 vs.1.044). Esto nos hace suponer que este punto de proteína podría estar desempeñando un papel importante en la raza San Martinero.

Las proteínas que se encontraron y que intervienen en la posible explicación del comportamiento del volumen seminal al considerar la época y la raza se enmarcan en proteínas como posibles BSP A1- A2, una proteína que se correlaciona en forma altamente significativa con la concentración espermática y a una proteína identificada como A4704 similar a una fosfolipasa A2. En estos términos podemos suponer que la participación de estos puntos de proteína es indirecta, y que por su acción propia a nivel de vesículas estimulen la secreción de líquidos seminales. Por otra parte, suponemos además que los valores obtenidos por efecto del clima pueden estar soportados por descompensación hídrica en la época seca.

VII.2.4.2. Concentración espermática

ÉPOCA

La concentración espermática ha sido una de las características que más sobresale en la raza San Martinero. Los resultados promedios señalan valores para la época lluviosa y seca de $996.38 \times 10^6 \pm 122.18$ y de $1.083.00 \times 10^6 \pm 182$ epz/ml, respectivamente, sin diferencias significativas, resultados superiores a los reportados por Jiménez *et al.*, (1996, 800.00×10^6 epz/ml) en toros San Martinero. Esta respuesta, a pesar de no mostrar diferencia significativa, pero sí una concentración mayor en la época seca, nos hace suponer que su incremento puede ser debido a la disminución del fluido seminal posiblemente por descompensación hídrica en esta época.

La explicación del comportamiento de la concentración espermática mediante los cambios observados en el perfil proteico en el modelo de regresión polinomial señalan a un grupo de proteínas que intervienen en forma significativa (A4113, A2301 como posible BSP A1, A5006, y A7304) con pesos moleculares 15.37, 16.74, 14.91 y 23.24 kDa y puntos isoeléctricos 5.38, 4.78, 5.87 y 6.24, respectivamente. De esta forma podríamos interpretar la participación de los puntos de proteínas con los valores estimados en forma predictiva del modelo de regresión polinomial ($Pr > F 0.034$) $R^2 = 0.4485$

Concentración= $1055.50 \times 10^6 - (A4113 * 3.6034) - (A2301 * 8.59601) + (A5006 * 12.0160) + (A7304 * 42.6684)$.

En este modelo observamos una gran influencia de la proteína A7304 en los cambios de comportamiento de la concentración. Es de anotar que aunque los puntos de proteína A4119, A507, A1407 y A2001, dentro del modelo, no indicaron cambios significativos, no quiere decir que no tengan algún nivel de participación.

Por otra parte al revisar los modelos de análisis se observa que en el estudio de proteína por proteína, mediante el procedimiento de STEPWISE, el punto de proteína A5006, con peso molecular 14.91 kDa y punto isoeléctrico 5.87, junto a la A7304 y a la A1407 como posible BSP A30, en forma significativa y con gran influencia de sus valores estimados, podrían estar explicando los cambios en la concentración espermática. Lo importante en este grupo de puntos de proteínas es la gran significancia del modelo y su coeficiente de determinación ($Pr > F$ 0.0013) y el $R^2=0.9476$.

$$\text{Concentración} = 1204,084 - (A5006 * 246,80254) + (A7304 * 32,66844) - (A1407 * 116,61404)$$

$Pr > F$ 0.013, $R^2=0.9476$

En este sentido, podemos señalar que la acción integrada de proteínas en diferentes arreglos podría estar explicando el comportamiento de la concentración espermática. En primer lugar el punto de proteína A4113 con acción inversa. Es posible, como se anotaba anteriormente, que esta proteína esté jugando un papel modulador importante en la producción de espermatozoides por el testículo o que sea un factor indicador de baja eficiencia. Las proteínas A2301 y A1407, con acción inversa como posibles BSP-A1 y BSP 30, son secretadas por la vesícula seminal y estarían posiblemente participando a nivel de dicha vesícula seminal en el estímulo de secreción del fluido, el cual influye en la concentración espermática por efecto de dilución. La proteína A7304 en el modelo de regresión múltiple y en el procedimiento de STEPWISE presenta una gran influencia directa si consideramos el valor estimado para la predicción.

Estos resultados sugieren que esta proteína podría estar desempeñando una labor importante en la producción de espermatozoides. El punto de proteína A5006, que tiene un peso molecular de 14.91 y un punto isoeléctrico de 5.87, con una significancia cercana al 5% en el modelo de regresión polinomial $Pr > F$ 0.0640, y con alta significación en el procedimiento de STEPWISE $Pr > F$ 0.0022 y gran influencia sobre el modelo, podría considerarse como importante en el comportamiento inverso sobre la concentración espermática. Un punto de proteína que también podría considerarse sería la A 3011, que como se anotó anteriormente podría desempeñar un papel importante en el funcionamiento del espermatozoide durante el periodo climático y podríamos ubicarla por su posición como semejante a una aSFP. Otro punto relevante es que estas acciones generalmente están dadas en forma grupal. Su posible acción pudiera ser como estimuladora de las vesículas seminales que influirían indirectamente con la concentración espermática por efectos de dilución.

Finalmente, aunque no existió diferencia significativa entre época, destaca el análisis independiente en donde en la época de lluvias vemos como el punto de proteína A2001 (posible BSP- A3) podría tener influencia sobre la concentración espermática por el efecto mencionado anteriormente de dilución. De igual manera ocurriría para la época seca con el punto de proteína A2301, definida como una posible BSP A1. Esto nos llevaría a pensar en una acción de la variación climática sobre la actividad de las BSP.

RAZA

La concentración espermática promedio del toro San Martinero es muy superior (altamente significativa) a la del toro Cebú ($996.38 \times 10^6 \pm 122.18$ epz/ml y $682.57 \times 10^6 \pm 185.29$ o 182 epz/ml, respectivamente), resultados similares a los obtenidos por Obando (1999). Esta es una de las características de esta raza bovina criolla, complementada por su poca variabilidad en el tiempo durante una misma época, situación que no es similar a la raza bovina Cebú, como se observa en los resultados descritos en este estudio. Esta respuesta resalta la gran estabilidad en cuanto a producción espermática del toro San Martinero.

Al analizar los modelos descritos en el apartado de resultados en este mismo tema, se observa la participación a nivel general de 3 proteínas A5101, A4113 y A4704 como posible PLA-2 que prevalecen en toros de alta fertilidad (Moura *et al.*, 2006). Lo que llama la atención es la significancia del modelo $Pr > F = 0.0312$ y el $R^2 = 0.9287$. La proteína A5101 señala una acción directa y un nivel de significancia ($p < 0.05$) con gran influencia en el modelo si observamos su valor estimado (87.76). La proteína A4113 muestra su participación inversa como se había denotado anteriormente, y la proteína A4704, presenta un nivel de significancia $dep < 0.05$, una acción directa y un nivel de influencia del modelo bastante considerable como lo señala su valor estimado (242.82). En este sentido, podríamos definir con base al comportamiento de las concentraciones espermáticas obtenidas entre la raza San Martinero y Cebú que las proteínas A5101 y A4704 podrían estar asociadas en forma directa, y el punto de proteína A4113 en forma indirecta, con concentración espermática. En términos generales la participación de estas proteínas quedaría orientadas así:

$$\text{Concentración espermática} = 383.54 + (A5101 \cdot 87.76) - (A4113 \cdot 55.69) + (A4704 \cdot 242.82)$$

A pesar de la significación del modelo anterior, no podemos ignorar a las proteínas A2001, A4119, A3218, A2301, A6310, A409, A1407 y A507, que no presentaron significancia al nivel definido, pues éstas de alguna forma intervienen para darle la fortaleza al modelo. De estas proteínas, al procesarlas por el procedimiento de análisis de componentes principales y correr el procedimiento de Stepwise, se señala nuevamente el punto de proteína A4113. Esto nos hace sugerir que este punto de proteína posiblemente juega un gran papel modulador en la producción de espermatozoides en el testículo o, por el contrario, es indicativa de baja producción.

Al considerar la respuesta de diferencia de medias y el análisis de raza específicamente, vemos cómo la proteína A5101 interviene directamente en el comportamiento de la concentración espermática en la raza San Martinero y la A4704 lo hace de igual forma en la raza Cebú. Aquí aparece otro punto de proteína (A6310) de peso molecular 26.10 y punto isoeléctrico 5.65, que posiblemente también esté explicando en forma inversa, junto al punto de proteína A4704, el comportamiento de la concentración espermática en la raza Cebú como lo demuestra la sensibilidad del modelo $Pr > F = 0.0005$ y su $R^2 = 0.99$. Por su posición, podríamos relacionar a la A 4704 con una fosfolipasa A₂ (PLA-2), que está relacionada

positivamente con la fertilidad, o con una albúmina, que tiene actividad sobre los procesos de capacitación y con posibles toros de alta fertilidad, y a la A6310 con la BSP-30 que está asociada con la fertilidad. En este sentido podríamos suponer que estos puntos de proteína estarían jugando un papel importante, en donde la concentración espermática participa en la definición de la calidad seminal

VII.2.4.3. Motilidad.

ÉPOCA

La motilidad espermática en la mayoría de las especies se adquiere durante su etapa de maduración a lo largo del epidídimo (Yanagimachi, 1981). El plasma seminal ejerce sobre los espermatozoides funciones que se refieren principalmente a nutrición, protección y regulación de la motilidad (Johnson *et al.*, 2000).

Esta característica evaluada en el eyaculado para este estudio no mostró ningún cambio significativo ($p > 0.05$) en el toro San Martinero cuando se comparó entre época lluviosa y época seca ($82.62 \pm 3.75\%$ vs. $76.90 \pm 14.53\%$). Esta particularidad, unida al comportamiento de la concentración espermática, muestra cómo esta raza, a través de los años, se ha adaptado a las variaciones climáticas del trópico bajo colombiano. Los resultados son algo superiores a los reportados por Turri *et al.* (2012) en toros Limousine (71.6%) bajo condiciones normales.

En este sentido vemos en los resultados obtenidos de los diferentes modelos utilizados cómo, en la selección de proteínas inicial por ACP, que el punto de proteína A6307 está asociado al comportamiento de los cambios de motilidad espermática en forma significativa, pero con una gran debilidad del modelo $Pr > F 0.0432 R^2 = 0.23$. Sin embargo, cuando el modelo es corrido con el total de proteínas seleccionadas sin considerar el ACP, el grupo de puntos de proteínas que pudiera explicar el comportamiento de la motilidad señala a la A2001, A7304 y al punto de proteína A6307, con un modelo que mejora su significancia y coeficiente de determinación $Pr > F 0.0047 R^2 0.99$. Las respuestas obtenidas, como se indica en el apartado de resultados, nos hacen pensar que la proteína A6307 desempeña un gran papel en el comportamiento de la motilidad pero requiere de las proteínas A2001, posible BSP A3, y A7304 para mejorar su actividad como lo señalan sus significancias y valores estimados.

RAZA

La comparación de la motilidad espermática entre la raza San Martinero y Cebú (82.62 ± 3.75 y $79.19 \pm 4.27\%$) señala cambios significativos ($p < 0.05$). El modelo de regresión polinomial a nivel general presenta una probabilidad $Pr > F 0.0785$, muy cercana a la definida como significativa. Sin embargo, los puntos de proteína A4113, A2301 y el punto de proteína A1407 mostraron cambios con diferencia significativa ($p < 0.05$). Esta respuesta nos estaría indicando que estos puntos de proteína posiblemente estarían involucrados en la explicación a nivel general del comportamiento de la motilidad. Llama la atención entre estas proteínas la A1407, que es la que mayor valor estimado presenta, y por ende mayor influencia sobre la definición

de la motilidad. Cuando este punto de proteína se evalúa en conjunto con las proteínas A5101, A4119 y A409 se observa que el modelo mejora su significancia $Pr>F$ 0.0024 y su $R^2 = 1.00$ para la raza Cebú. Resalta nuevamente la influencia de la proteína A1407 por su valor estimado y significancia en el grupo de proteínas que posiblemente para este caso estarían explicando, los cambios en motilidad del toro Cebú.

VII.2.4.4. Viabilidad espermática

ÉPOCA

La viabilidad espermática es uno de los indicadores de importancia en la evaluación de la eficiencia reproductiva de un semental. En este estudio, la variación climática observada entre la época seca y lluviosa no muestra efecto significativo sobre la viabilidad espermática del toro criollo San Martinero (75.57 ± 4.27 vs. 69.48 ± 15.27). Los resultados de la época lluviosa son similares a los que reportan en condiciones normales Srivastava *et al.* (2012) en toros cruzados (75.17%) y Turri *et al.* (2012) en toros Limousine (77.2%).

En viabilidad no es muy clara ni fuerte la participación de las proteínas seleccionadas en grupo. Sin embargo, los resultados obtenidos en el modelo y analizados para regresión polinomial indican un $Pr>F$ 0.0769 y un $R^2=0.62$, que involucran como puntos de proteína significativos al A2301 y al A1407, con gran influencia sobre el modelo. Estos puntos de proteína podrían estar identificados posiblemente por su posición como de la familia BSP, más exactamente BSP-A1 y BSP 30 kDa, respectivamente. Estas proteínas, que en principio tienen actividad sobre la capacitación y los cambios en la membrana plasmática (Manjunath *et al.*, 2007), tendrían también responsabilidad sobre la viabilidad, como lo señalan los resultados obtenidos en este estudio.

$$\text{Viabilidad} = 44.76 + (\text{A2301} * 0.1165) + (\text{A1407} * 7.0209)$$

RAZA

Cuando comparamos la raza bovina San Martinero con la raza Cebú Brahman, en términos de porcentaje de viabilidad espermática (75.57 ± 4.27 vs. 74.33 ± 3.92), no observamos cambios significativos ni entre raza ni entre muestreos ni en su interacción. Esto nos lleva a pensar que la respuesta de esta variable tan importante nos estaría indicando que estas razas responden similarmente bajo las condiciones del trópico bajo colombiano.

Cuando analizamos la participación de las proteínas del plasma seminal sobre la viabilidad espermática de las razas San Martinero y Cebú, bajo el modelo de regresión polinomial, podemos predecir que la participación del grupo de puntos de proteínas en forma significativa (A4113, A2301 como posible BSP-A1, y A6310), podría explicar el comportamiento de la viabilidad espermática junto al grupo de proteínas del modelo que, aunque no fueron significativas ($p>0.05$), participan de alguna manera. Con este conjunto de puntos de proteína

podemos resaltar la significancia lograda ($Pr > F$ 0.0317 $R^2 = 0.93$). En términos generales la expresión significativa estaría dada principalmente por:

$$\text{Viabilidad} = 82.32 - (A4113 * 0.79) - (A2301 * 0.35) - (A6310 * 2.94)$$

La respuesta es validada cuando se analiza por el método de STEPWISE, que ratifica a estos tres puntos de proteínas como posibles participantes del comportamiento de la viabilidad.

A pesar de la no diferencia entre razas, se observa en los análisis de resultados que existen dos puntos de proteínas que podrían estar participando en forma independiente, tanto en la raza San Martinero, el A4119, como en la Cebú, el A2001, definido por su posición como una posible BSP-A3.

El punto de proteína A4113 se asocia inversamente con la concentración espermática y la viabilidad, mientras que el punto A2301 se asocia con viabilidad. Si aceptamos que la A2301 es una BSP A1, estaríamos respaldando este resultado. El punto de proteína A6310 como se explicó anteriormente, tiene una posible participación en el comportamiento de la concentración espermática en la raza Cebú, y aquí en este análisis vemos que su participación es importante, si consideramos también que se observa su gran influencia sobre el comportamiento de la viabilidad en razón al valor estimado en el modelo. El punto de proteína A4119 es un punto de proteína que por su significancia en la evaluación individual y su participación a nivel de la raza San Martinero, debe ser considerada como se describió anteriormente y finalmente la A2001 presenta una asociación inversa con viabilidad en la raza Cebú.

VII.2.4.5. Morfología espermática.

ÉPOCA

La valoración morfológica de los espermatozoides fijados, teñidos y determinados como normales en este estudio mostró como respuesta que, cuando evaluamos en forma comparativa el semen del toro San Martinero en la época lluviosa con la época seca, no se diferencian cambios significativos (86.19 ± 6.67 vs. 82.10 ± 6.56), al igual que lo que se obtuvo en viabilidad. Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Bucak *et al.*, (2012, 69,40%) y Mandal *et al.*, (2010, 75.11%) en toros de origen europeo. Cuando se realizan análisis para evaluar la participación de proteínas del plasma seminal en la explicación de los porcentajes de espermatozoides normales, no se hace evidente ningún punto de proteína o grupo de proteínas de los estudiados con cambios fuertes que nos puedan apoyar este resultado. Sin embargo, se observa que el punto de proteína A4119 muestra significancia ($p < 0.05$) pero con un $r = -0.35$. Esto sugiere que por su nivel de asociación tan bajo ésta no sería una proteína a considerar asociada a la morfología espermática. Así mismo, se debe considerar que los cambios de este tipo de variable tienen

lugar más a nivel testicular y epididimal, por lo que se puede inferir que no hay efecto alguno de la proteína.

RAZA

El indicador de morfología, vista como porcentaje de espermatozoides normales entre el semen del toro San Martinero y el Cebú Brahman (86.19 ± 6.67 vs. 82.05 ± 2.09), no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$), al igual que la obtenida cuando se efectuaron las comparaciones de viabilidad. En el análisis de los cambios de esta variable en las razas estudiadas, se observa la participación en forma significativa del punto de proteína A4119 a nivel general, pero desafortunadamente el modelo presenta gran debilidad por lo que su consideración no es viable. De igual forma sucede con el punto de proteína A4113, de peso molecular 15.37 kDa y punto isoeléctrico 5.38.

Los resultados obtenidos de las variables anteriormente estudiadas indican que entre época la diferencia no demuestra cambios significativos para concentración motilidad, viabilidad y morfología, mientras que las comparaciones entre razas evidencian diferencias significativas para concentración y motilidad espermática. Estas diferencias están explicadas por las asociaciones de grupos de proteínas.

VII.2.4.6. Índice de calidad espermática.

ÉPOCA

El índice propuesto integra los indicadores concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática para tener una mejor visión de la calidad espermática de un eyaculado. En este sentido se observa que el índice denominado como de calidad espermática con valores promedio de 0.54 ± 0.33 vs. 0.49 ± 0.17 no es afectado por efecto de la época en el toro criollo San Martinero. Esta respuesta nos hace suponer que el toro criollo San Martinero es una raza que se ha adaptado muy bien a las condiciones del trópico bajo colombiano y que la variación climática no influye sobre indicadores de salida como lo es el índice de calidad espermática.

La explicación del comportamiento del índice de calidad espermática indagada desde la composición proteica del plasma seminal indica que el grupo de puntos de proteínas con cambios significativos ($p < 0.05$) está dado por los puntos de proteína A4113, A4119 y A2001 que por su posición podríamos posiblemente definirla como BSPA-3 y A6307. Es de anotar que las proteínas A2301 y A1407 carecen de significancia ($p > 0.05$) pero que al integrarlas con los puntos de proteína que mostraron cambios significantes se soporta todo el modelo ($\text{Pr} > F 0.015$ con $R^2 0.67$).

Los análisis de correlación parcial indican asociaciones significantes ($p < 0.05$), pero con coeficientes inferiores a 0.39 de los puntos de proteína A5006 y A7304. La asociación de estos puntos de proteína tan bajos no amerita su consideración.

Con respecto al grupo de proteínas que estarían explicando el comportamiento del índice de calidad espermática podemos decir que el punto de proteína A4113 es un punto proteína que en este estudio mostró una gran asociación con la concentración espermática, variable que hace parte de este índice. El punto de proteína A4119 es un punto que se asocia bien con viabilidad y su participación se ve reflejada en el índice de calidad en forma significativa. El punto de proteína A2001 está definido como posiblemente una BSP, más exactamente una BSP A3. El punto de proteína A6307 es un punto que en el modelo muestra gran influencia si observamos su valor estimado y podría estar desempeñando un papel importante en el comportamiento de alguna de las variables que integran el índice de calidad como puede ser el caso de motilidad.

RAZA

Cuando comparamos el índice de calidad espermática del ganado San Martinero con el Cebú Brahman (0.54 ± 0.33 vs. 0.33 ± 0.09) se observa un efecto de la raza altamente significativo ($Pr > F < 0.001$). Además se observaron cambios significativos para la interacción repetición con raza, la cual está dada por la variación de la respuesta en el tiempo de muestreo en la raza Cebú, pero sus valores son inferiores a la raza San Martinero en forma significativa ($p < 0.05$). Estas respuestas señalan el mejor comportamiento del toro San Martinero.

El índice de calidad espermático cuando es explicado por los cambios de las proteínas del plasma seminal, sugiere especialmente, desde el análisis de resultados a nivel general entre la raza San Martinero y Cebú, la participación del punto de proteína A4113 en forma significativa ($p < 0.05$). Este punto está asociado con concentración espermática, motilidad y morfología, que son variables que integra el índice, y a nivel de raza San Martinero el grupo de proteínas A2001, que por su posición puede ser una BSP-A3, A3218 como posible BSP-A2 y A4704, como posible PLA-2, podrían explicar el comportamiento del índice de calidad espermática con una excelente definición ($Pr > F 0.0014$ y $R^2 = 0.99$). Para la raza Cebú, el análisis de correlación parcial considera los puntos de proteína A2001 ($p < 0.05$; $r = -0.87$) y el A2301 ($p = 0.0591$; $r = 0.73$).

VII.2.4.7. Producción de espermatozoides congelables (número de pajillas congeladas)

ÉPOCA

El indicador de producción de espermatozoides congelables visto desde el número de pajillas congeladas a 30×10^6 de espermatozoides/ pajilla, que involucra el volumen, nos estaría mostrando la eficiencia de los toros reproductores examinados desde su calidad post-descongelación. En este sentido, los toros de raza criolla San Martinero evaluados en este estudio señalan cambios significativos ($p < 0.05$) por efecto de la época en producción de

pajillas congelables (166.06 ± 35.54 vs. 101.1 ± 57.6). Para la discusión es importante resaltar que en las variables concentración, motilidad, viabilidad, morfología e índice de calidad espermática, no se observaron diferencias entre épocas, mientras que la variable volumen, sí señaló cambios significativos. Sin embargo, cuando en el análisis no se considera el volumen total, sino la unidad (mL), los resultados indican que no hay efecto de la época ($p > 0.05$). En este sentido podemos considerar al volumen como el indicador que en mayor parte explica el cambio significativo de la producción de pajillas congelables, más no la calidad espermática.

La participación de las proteínas del plasma seminal para explicar este indicador de producción espermática a nivel general involucra al punto de proteína A1407, en forma significativa ($p < 0.05$). Esta proteína muestra un comportamiento de gran influencia en el modelo cuando se analiza en forma grupal con otras proteínas que no mostraron significancia ($p > 0.05$), pero que le dan fortaleza al modelo ($\text{Pr} > F 0.0286$ R^2 0.70). Cuando este punto de proteína se evalúa en forma individual, su fortaleza se debilita como lo indica el modelo analizado en los resultados ($\text{Pr} > F 0.0265$ R^2 0.26). Una vez más, este hecho nos lleva a definir que las acciones de las proteínas se realizan en forma grupal. Por otra parte, cuando se analiza en la época de lluvias, se resalta en forma significativa ($p < 0.05$) el punto de proteína A5101 con gran influencia en la definición del modelo ($\text{Pr} > F 0.041$ R^2 0.99). Esto nos sugiere que este punto de proteína posiblemente estaría desempeñando un gran papel en este indicador de producción espermática, desde la variable volumen. Finalmente, cuando se hacen análisis puntuales de correlación parcial podríamos estar vinculando a los puntos de proteína A7304 con asociaciones con producción espermática congelable ($r = 0.42$; $p < 0.05$) a nivel general y para la raza San Martinero ($r = 0.55$; $p < 0.05$), y al punto de proteína A6307 igualmente con la producción espermática congelable ($r = 0.41$; $p < 0.05$) a nivel general.

RAZA

La producción de espermatozoides congelables es bien diferenciada ($p < 0.001$) cuando se compara entre las razas San Martinero y Cebú (166.06 ± 35.54 vs. 71.37 ± 31.59). Los resultados obtenidos nos indican una mejor capacidad de respuesta de la raza San Martinero bajo las condiciones del trópico bajo Colombiano, lo que nos confirma que esta raza, desde su introducción a estas regiones, ha venido sufriendo cambios que la colocan ahora como una raza adaptada a pesar de ser de origen europeo. En el análisis, además, se observa efecto de la interacción entre repeticiones en forma significativa. En este sentido la influencia está dada en la segunda repetición, posiblemente por acción de las derivaciones realizadas para sacar esta variable desde el volumen, concentración, motilidad viabilidad y morfología.

Los modelos de análisis evaluados muestran los puntos de proteína A4113 y A4704 como posible PLA-2 con cambios significativos a nivel general a pesar de la diferencia existente entre razas. Cuando analizamos a nivel de raza, observamos únicamente para la raza Cebú influencia significativa ($p < 0.05$) de los puntos de proteína A4704 y A6310. Los puntos de proteína A4113 determinada a nivel general, como se explicó anteriormente están asociados

con concentración espermática, mas por el lado de la dilución, pero que puede desempeñar un gran papel en el comportamiento de salida de la respuesta. El punto de proteína A4704 es un punto de proteína que por su significancia e influencia sobre el modelo podría estar jugando un papel importante en la definición de los espermatozoides congelables y finalmente el punto de proteína A6310, por su participación en la explicación del comportamiento de la concentración y viabilidad, como se anotó anteriormente, estaría posiblemente jugando un importante papel en el resultado de los espermatozoides congelables. Lo importante de estas definiciones es que su fortaleza de acción se da cuando se evalúan en forma grupal.

VII.2.5. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DE CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN POST-DESCONGELADO ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO EN ÉPOCA SECA Y LLUVIOSA Y POR EFECTO DE LA RAZA AL COMPARARLA CON EL CEBÚ.

VII.2.5.1. Motilidad espermática post-descongelación

La evaluación de la motilidad, tanto de semen fresco como post-descongelado, se realizó bajo el mismo criterio. En este sentido observamos que estos cambios de fresco a post-descongelado son altamente significativos. Se observaron cambios en los valores de motilidad del semen fresco y el semen post-descongelado, tanto en la época lluviosa ($82.62 \pm 3.75\%$ vs 41.49 ± 5.43), como en la seca ($76.90 \pm 14.53\%$ vs $39,14 \pm 4.79\%$) en el ganado Sanmartinero. La diferencia entre los dos estados de congelación superó el 35%.

ÉPOCA

Los cambios observados en motilidad de espermatozoides post-descogelados no son significativos por efecto de la época ($p > 0.05$). Esta respuesta es similar a los resultados obtenidos en la evaluación del semen en fresco, en donde tampoco se observaron cambios significativos por efecto de la época. Esto sugiere que el semen de Sanmartinero debe tener una batería de sustancia que le permiten mantener los porcentajes de motilidad entre época tanto en el semen fresco como en el congelado. De la literatura revisada no se registró información similar.

Esta variable de porcentaje de motilidad no pudo ser explicada desde las proteínas del plasma seminal de forma consistente. Sin embargo, se observa un nivel de asociación aunque bajo, del punto de proteína A507. Por otra parte, aunque la literatura consultada no lo reporta, esta proteína posiblemente podría estar induciendo procesos de fosforilización para que se incremente la motilidad, pero como se anotó anteriormente su nivel de asociación es tan bajo que podría determinarse como sin un efecto definido.

RAZA

Cuando evaluamos el porcentaje de motilidad post-descongelación entre la raza San Martinero y la raza Cebú (41.49 ± 5.43 vs 35.66 ± 4.93), se observan diferencias significativas

($p < 0.05$), posiblemente reflejadas por la mejor calidad del semen San Martinero en fresco, lo que le permitiría superar de mejor manera el proceso de criopreservación.

La explicación mediante proteínas del plasma seminal del comportamiento de la motilidad en las razas San Martinero y Cebú podría ser vista desde algunas asociaciones puntuales obtenidas mediante el análisis por correlaciones parciales. En este sentido, se observa que la proteína A4113 en forma inversa, estarían asociada con la motilidad post-descongelación ($p < 0.05$; $r = -0.41$), al igual que la proteína A4119 ($p < 0.05$; $r = -0.48$) y, en forma directa, la proteína A2301, pero con un nivel de asociación bastante bajo ($p < 0.05$; $r = 0.32$).

Por otra parte, el punto de proteína A6310 se encontró en la raza San Martinero asociado en forma directa con motilidad post-descongelación ($p < 0.05$) en un modelo de fortaleza media ($Pr > F 0.0075$ y $R^2 = 0.57$) y el punto de proteína A1407 (posible BSP-30) se encontró asociado en forma inversa con el porcentaje de motilidad del toro Cebú ($p < 0.05$; $r = -0.55$). El punto de proteína A4113 en los análisis en fresco está asociada a través un grupo de proteínas o en forma independiente con concentración, viabilidad y morfología. De igual manera encontramos la A4119 con los mismos tipos de asociación con motilidad, viabilidad y morfología en fresco y la proteína A2301, con concentración, motilidad y viabilidad. Estas situaciones pueden en forma indirecta brindarle condiciones de calidad antes de la congelación al espermatozoide que le permitan soportar el proceso de criopreservación y expresar post-descongelación la motilidad espermática o posiblemente actúen a nivel de protección del espermatozoide.

Los puntos de proteína A6310, y sus asociaciones con concentración, viabilidad y morfología, y la A1407, con concentración, motilidad y viabilidad referidas anteriormente, podrían estar actuando como indicadores que contribuyan a la predicción de calidad espermática.

VII.2.5.2. Viabilidad espermática post-descongelación

ÉPOCA

La viabilidad espermática post-descongelación es uno de los indicadores importantes de calidad del semen. Los valores obtenidos en este estudio para el semen colectado y congelado en la época lluviosa y seca con respecto a la viabilidad en semen fresco (62.77 ± 3.12 vs. 58.20 ± 4.34) señalan diferencia significativa, contrario a lo que se encontró en semen fresco. Estos resultados muestran, en términos generales, respuesta de esta variable a los procesos de congelación cuando el semen es colectado en diferente época. Los hallazgos de viabilidad post-descongelación son similares a los reportados por Srivastava *et al.* (2012) en toros cruzados (60.33 ± 2.19) y por Shojaei *et al.* (2012) en toros Holstein (60.6 ± 97).

La explicación revisada desde la proteómica señala a un solo punto de proteína (A507) a niveles significativos ($p < 0.05$) que pudiera estar explicando los comportamientos de la viabilidad espermática. Sin embargo hay tres proteínas muy cercanas a este nivel de

significancia con un buen nivel de influencia sobre el modelo que en forma integrada con la A507, como posible BSP-30 kDa, seguramente estarían explicando con un mayor nivel de confianza el comportamiento de esta variable de la calidad espermática por efecto de la variación climática. El grupo podría estar expresado así:

$$\text{Viabilidad} = 59.80 - (A5006 * - 4.50) + (A1407 * 20.74) + (A2001 * 2.04) - (A507 * 14.29)$$

Las proteínas que integran el modelo y no presentaron cambios significativos, la A4113 y A2301 como posible BSP-A1, estarían de alguna forma participando para darle fortaleza al modelo ($\text{Pr}>F$ 0.045 $R^2 = 0.95$).

En la respuesta es de resaltar la influencia de definición de los cambios de viabilidad de los puntos de proteína A5006 y A1407, si consideramos su valor estimado. El punto de proteína A5006 es un punto de proteína no referenciado pero muy cercano al que sugieren Moura *et al.* (2007^a) como BSP A1/A2. Lo mismo ocurre con los puntos de proteína A1407, como un posible BSP-30 y el punto de proteína A507, como posible BSP-30. Es posible que sea un reflejo de la calidad del espermatozoide en fresco, aunque estos puntos no se ha reportado hasta ahora que estén asociados con congelabilidad, por lo que este dato de nuestro estudio resulta de interés para futuras investigaciones.

RAZA

Cuando comparamos la viabilidad espermática post-descongelación del toro San Martinero con el Cebú, se ve un efecto fuerte de la raza en el comportamiento de esta variable (62.77 ± 3.12 vs. 52.97 ± 6.10). En este sentido, cuando tratamos de relacionar las proteínas del plasma seminal con este comportamiento observamos a nivel general que el punto de proteína A4119 podría estar explicando este comportamiento. Por otra parte, aquí el punto de proteína A4113 estaría señalando el comportamiento de esta variable en la raza San Martinero. Estas proteínas en fresco ya han sido asociadas con viabilidad y/o concentración y morfología en este estudio. Estas asociaciones posiblemente son las que le han permitido en fresco mantener o mejorar la calidad espermática, condición que le favorece a los espermatozoides en su proceso de congelación.

VII.2.5.3. Morfología espermática post-descongelación

ÉPOCA

Los porcentajes de espermatozoides normales post-descongelación, indicador de calidad espermática que para este estudio señaló cambios significativos por efecto de la época en toros San Martinero (80.14 ± 4.17 vs. 75.43 ± 3.66), posiblemente estén dados como respuesta a la sumatoria del comportamiento por época de las variables de calidad espermática en fresco que, a pesar de no ser significativas sí muestran un menor valor en la época seca. Esta situación puede verse agravada por el proceso de congelación que resalta esa disminución a términos significativos cuando se realiza la evaluación de calidad post-descongelación.

El efecto de la época indudablemente es resaltado en la evaluación de espermatozoides descongelados. Este efecto del cambio climático temporal por parte de la época seca pudiera ser explicado en forma significativa por los puntos de proteína A4113 y el A4119, que sumados a los puntos que no mostraron diferencias significativa A1407, A2001 y A507 definieron un modelo con gran fortaleza ($Pr > F$ 0.0204 R^2 0.80). A pesar de no ser significativa se resalta la influencia en el modelo de la A1407 (posible BSP 30kDa) por el valor estimado que registra y que se define como significativo al ser analizada por STEPWISE. En este sentido la explicación principal de la morfología podría estar dado por:

$$\text{Espermatozoides normales (morfología)} = 79.33 + (A4113 * 0.928) - (A4119 * 0.372) - (A1407 * 0.372). \text{ Pr} > F 0,0204 \text{ R}^2 = 0,8034$$

Los puntos de proteína A4113 y A4119 han mostrado en este estudio posibles asociaciones, en conjunto con otras proteínas, con viabilidad, morfología e índice de calidad espermática y/o concentración en fresco. El punto A1407 incluido en este análisis señala una muy buena influencia sobre el modelo. Estas proteínas en conjunto contribuyen a justificar en parte el resultado obtenido post-descongelación en forma significativa como lo explicamos en la parte de viabilidad en fresco, en donde el mayor número de espermatozoides normales se encuentran en los eyaculados de la época de invierno.

RAZA

Cuando comparamos los porcentajes de espermatozoides normales entre las dos razas en estudio, vemos que no se presentó diferencia en este aspecto (80.14 ± 4.71 vs. 79.46 ± 3.01), comportamiento que, explicado desde la proteómica, podría estar vinculando al punto de proteína A4704, como posible PLA-2, con una gran influencia sobre el modelo, en donde participan 5 puntos de proteína sin ningún peso significativo. Desafortunadamente, el modelo no es bien soportado por su coeficiente de determinación. Cuando el análisis se hace puntual por correlaciones parciales, se observa en este mismo punto de proteína una asociación de $r = -0.43$ $p < 0.05$. En términos generales vemos que no se observa una proteína que explique en forma contundente el comportamiento de la variable en estudio.

VII.2.5.4. Índice de calidad espermática post-descongelación

ÉPOCA

El índice de calidad espermática post-descongelación integra las variables de motilidad, morfología y viabilidad y es el verdadero reflejo de la calidad espermática. En este sentido vemos como el índice sí es afectado por la época seca, comportamiento que se podría explicar desde la proteómica por los puntos de proteína del plasma seminal A4113 y A1407, resaltando la significancia del modelo ($Pr > F$ 0.01, R^2 0.95). Para la época lluviosa destaca el punto de proteína A7304, en donde el modelo que lo soporta es altamente determinante $Pr > F$ 0.036 $R^2 = 0.99$).

RAZA

El índice de calidad espermática es afectado por la raza y su mejor expresión la observamos en raza San Martinero (0.21 ± 0.09 vs. 0.15 ± 0.03). Los puntos de proteína del plasma seminal que posiblemente estén interviniendo en su explicación a nivel general son el A5101 y A4119 bajo un modelo no muy fuerte. Sin embargo, cuando se evalúan en forma puntual por coeficientes de correlación parciales observamos a nivel general que las asociaciones para A4113 y A 4119 son altamente significativas ($r = -0.62$ y $r = -0.59$), y algo menos para A4704 (posible PLA-2) ($p < 0.05$; $r = -0.43$) y para A2301 ($p < 0.05$; $r = 0.35$), como posible BSP-A1. Estos tres puntos serían los que estarían explicando el comportamiento del índice de calidad espermática. Los comportamientos a nivel puntual en la raza San Martinero, estarían explicados por la A6310 y para el Cebú por la A4113 y A1407.

El punto de proteína A4113 en los análisis realizados *in vivo* señaló a nivel grupal posibles explicaciones del comportamiento de la concentración, viabilidad y morfología del espermatozoide en fresco. Esto nos llevaría a pensar que este punto de proteína señala compromiso con la explicación de la calidad espermática en fresco. Igualmente, el punto de proteína A1407, ligada en la explicación de motilidad y viabilidad en semen fresco, podría estar desempeñando un papel importante en la dilucidación de la eficiencia espermática en fresco. Estas dos proteínas en conjunto, como lo indica el modelo en el toro San Martinero, posiblemente estarían explicando esta variable con respecto al efecto de la época a nivel general y el punto de proteína A7304, que se ha asociado con concentración y motilidad, podría estar contribuyendo con la explicación del índice de calidad post-descongelación a nivel de la época lluviosa para la raza San Martinero. En términos generales, se considera un efecto más de protección antes del proceso de congelación espermática que influiría con los resultados obtenidos en post-descongelación. Por otra parte, si la consideración va más allá podríamos vincular estas proteínas como de protección a los procesos de congelación.

El análisis puntual de correlaciones parciales nos indica nuevamente la participación a nivel general de la A4113 en forma altamente significativa, lo que nos corrobora su acción aquí. La A4119 analizada en este sentido señala una asociación de $r = -0.59$ en forma altamente significativa y finalmente se observa la participación del punto de proteína A6310 ligada a la posible explicación del comportamiento de concentración, viabilidad y morfología en espermatozoides en fresco. Este punto de proteína está más asociado a la explicación del comportamiento del índice de calidad espermática en la raza San Martinero y el punto de proteína A1407 con la raza Cebú. Su participación en términos generales la consideramos en el mismo sentido de interpretación que las anteriores.

VII.2.6. COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO DE FECUNDACIÓN *IN VITRO* ASOCIADAS A LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL DEL GANADO SAN MARTINERO EN ÉPOCAS LLUVIOSA Y SECA COMPARADO CON CEBÚ BRAHMAN.

VII.2.6.1. Porcentaje de fertilidad (2PN)

ÉPOCA

El porcentaje de fertilidad revisado desde la fecundación *in vitro* del toro San Martinero no demuestra diferencia significativa por efecto de la época lluviosa y seca. Estos resultados nos indican que los espermatozoides del toro San Martinero producto del proceso de congelación en cada época, cuando son utilizados para fecundación *in vitro*, no ven afectada su eficiencia. Los valores obtenidos para la época lluviosa y seca (65.30 ± 8.95 vs. 64.83 ± 9.35), son valores similares a los que registra en sus informes el laboratorio del CRIA (centro de reproducción integral animal CI La Libertad, Colombia).

A pesar de no mostrar diferencia significativa entre época, en los análisis resalta la explicación de esta variable más en la época lluviosa por los puntos de proteína con cambios significativos.

Expresión de la ecuación de predicción.

$2PN = 74.05 - (A4106 * -2.94) + (A6307 * 1.462) - (A3218 * 1.84) - (A5101 * 6.034) - (A3011 * 9.36) + (A4113 * 6.81)$ sin desconocer la participación aunque no significativa en este modelo del punto de proteína A7304.

La gran fortaleza del modelo ($Pr > F 0.0171$; $R^2 = 0.999$) nos lleva a pensar que la fertilidad *in vitro* puede ser explicada posiblemente con mayor aproximación en la época lluviosa, por el comportamiento de los puntos de proteína definidos en la ecuación y que el punto de proteína A7304 podría estar explicando el comportamiento de esta variable en la época seca y a nivel general.

El punto de proteína A4106, por su nivel de influencia en el modelo podríamos suponer que tiene un papel fundamental en el comportamiento de la fertilidad *in vitro*. El punto de proteína A6307 es un punto de proteína que se relacionó con motilidad en fresco y que se asoció con

otras proteínas generando un modelo con gran definición. Esta condición contribuye a la mejor fertilidad *in vitro*. El punto de proteína A3218, definido como una posible BSP -A2, pudiera estar actuando para prevenir la prematura reacción acrosómica del espermatozoide (Therien *et al.*, 2002). El punto de proteína A5101 tiene una gran influencia de definición en el modelo y es posible que esta proteína esté desempeñando un papel importante en la fecundación. El punto de proteína A3011 se ha definido como una posible aSFP. Esta proteína ha sido reportada con acciones de factor decapacitante del espermatozoide de los toros (Dòstolová *et al.*, 1994), previniendo la prematura capacitación y reacción acrosómica por lo que para

que se produzca la fecundación *in vitro* es necesario que se libere esta proteína de la membrana espermática. El punto de proteína A4113 es una proteína con buena influencia que considerada en grupo podría estar desempeñando un papel relevante en la fertilidad.

RAZA

El porcentaje de fertilidad *in vitro* de los espermatozoides de la raza San Martinero es superior al de la raza Cebú Brahman (65.30 ± 8.95 vs. 57.95 ± 9.11). Esta gran diferencia en este indicador resalta el desempeño de calidad espermática de esta raza comparada con la Cebú bajo las condiciones del trópico bajo.

Los puntos de proteína que pueden explicar este comportamiento en la raza Cebú con un buen nivel de significancia bajo un modelo de considerable fortaleza son los puntos de proteína A2001 (posible BSP-A3) y A4704 (posible PLA-2). Es de anotar que a pesar de no mostrar respuestas significantes bajo el criterio considerado no se debe desconocer la participación de los puntos de proteína que no mostraron significancia (A4113, A4119 y la A507).

$$2PN = 65.22 - (A2001 * 4.735) - (A4704 * 6.486) - (A409 * 7.975)$$

El punto de proteína A2001, definida como una posible BSP-A3, contribuye con la preservación de la fertilidad del semen del toro (Gwathmey *et al.*, 2006) y podría estar desempeñando un papel importante en este comportamiento de la raza Cebú. El punto de proteína A4704 posiblemente por su posición definida como una fosfolipasa A₂ (PLA-2) está relacionada positivamente con la fertilidad *in vivo* y participa en la interacción espermatozoide-ovocito siendo activada por la interacción espermatozoide-zona pelúcida (Miller y Winer 1990, Riffo *et al.*, 1997 y Kelly *et al.*, 2006) y el punto de proteína A409, que en el modelo presenta una gran influencia si evaluamos el valor estimado, podría estar desempeñando un gran papel en los procesos de fertilización.

El hecho de que esta proteína se correlacione negativamente con el porcentaje de espermatozoides móviles del eyaculado sugiere la posibilidad de que esté ejerciendo una función de antimotilidad, que le permitirá al espermatozoide regularizar el gasto energético en su trayecto por el tracto reproductivo de la hembra en su camino al encuentro con el ovocito.

VII.2.6.2. Blastocistos

ÉPOCA

El efecto de la época de colección del espermatozoide del toro San Martinero para su procesamiento de congelación y contribución en la fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario (medido como porcentaje de blastocistos) en este estudio, no presentó diferencias significativas ($32.12 \pm 7.75\%$ vs. $29.85 \pm 6.66\%$). Los promedios obtenidos son similares a los reportados por Gómez *et al.* (2012, $35.4 \pm 1.16\%$) y por Ahuja *et al.* (2009) en

ovocitos de vacas Cebú. El comportamiento de los porcentajes de blastocistos por época en éste estudio, débilmente podría ser explicado por el punto de proteína A4119, si consideramos su nivel de asociación a nivel general ($p < 0.05$; $r = -0.32$). El punto de proteína A2001 (posible BSP-A3), expresado por el modelo de predicción STEPWISE de SAS $Pr > F$ 0.026 $R^2 = 0.99$, podría estar explicando el comportamiento de esta variable en la época seca.

RAZA

La respuesta obtenida al comparar el porcentaje de blastocistos no muestra diferencias significativas si consideramos estrictamente los niveles establecidos para el α $p < 0.05$, aunque, en este estudio el p obtenido estuvo muy cerca al establecido ($p = 0.0508$). A este límite de significancia se observa que los promedios obtenidos de producción de embriones San Martinero son superiores a los obtenidos en la raza Cebú (32.12 ± 7.75 vs. 25.35 ± 8.35).

Los resultados obtenidos definen al punto de proteína A409 como una posible proteína que explica en forma significativa a nivel general y para la raza Cebú, el comportamiento de producción de blastocistos, bajo un modelo significativo $Pr > F$ 0.0261 R^2 0.75. Por otra parte se observa la participación del punto de proteína A4113, pero con un nivel de asociación muy bajo a nivel general ($p < 0.05$; $r = -0.30$). La respuesta de estas proteínas posiblemente son respuestas de efectos sobre la actividad espermática en fresco como se ha explicado anteriormente que le optimiza las condiciones para su proceso de fecundación y formación de embriones que alcanzan el nivel de blastocistos.

VII.2.7. COMPORTAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PUNTOS DE PROTEINAS SELECCIONADAS DEL PLASMA SEMINAL EN LA EPOCA LLUVIOSA, SECA Y POR RAZA

ÉPOCA

De los puntos de proteína seleccionados, es claro que los puntos A2301 definida como una posible BSPA1; A3011 definida como una posible aSFP y el A7304 exhibieron cambios significativos en su concentración por efecto de la época siendo menor en la época seca para la A2301 (posible BSP-A1) y A7304 y mayor para la A3011. Esto hace pensar que la variación climática temporal de lluvioso a seco influye en forma negativa o positiva en ciertos puntos de proteína como mecanismo de respuesta para mantener la eficiencia de la calidad espermática, como se describe en el apartado anterior. El punto de proteína A4119 es el que muestra una diferencia significativa entre la segunda y tercera repetición en el tiempo, efecto que puede estar generando algún ruido en su interpretación, más aun cuando se ve un efecto significativo de la interacción de la época con la repetición; de igual forma podemos señalar al punto de proteína A5006.

RAZA

Por otra parte, en la raza San Martinero con respecto a la raza Cebú, la A2301, definida como una posible BSP-A1 presentó concentraciones proteicas superiores en forma significativa. De los 11 puntos de proteína seleccionados los que mostraron mayor concentración que en el toro Cebú Brahman fueron A5101, A4113, A4119, A2301, A6310 y A4704 en forma significativa ($p < 0.05$). Esto nos lleva a suponer que la proteína BSP de mayor concentración en el toro San Martinero estaría jugando un papel muy importante que lo hace diferente del toro Cebú en cuanto a eficiencia reproductiva. Por otra parte, la interacción raza repetición es clara en los puntos de proteína A4119 y A4704, que muestra la superioridad de los valores de concentración en la raza Cebú y prácticamente el efecto de la interacción en el punto de proteína está dado por la repetición 3, que no afectan las interpretaciones realizadas.

VII.2.8. ASOCIACIÓN ENTRE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL.

En este tema, las acciones similares o complementarias de los puntos de proteínas seleccionados, al hacerlo puntualmente por niveles de asociación, podrían estar generando información que permita apoyar la toma de decisiones. En este estudio, en el toro San Martinero a nivel general, podemos sugerir a los puntos de proteína A7304-A6307 y A1407-A507 como los más próximos con coeficientes de correlación entre 0.64 y 0.65. Cuando consideramos la época vemos como estas dos asociaciones son las que más se aproximan en la época, lluviosa, junto a la asociación A5006-A3218 y en la época seca A2001-A505; A3011-A5101; A4106-A6307; A4119-A3218 y A1407-A507. Estas asociaciones sugieren posiblemente comportamiento similar entre proteínas cuando se revisa desde la concentración proteica; sin embargo, las asociaciones no reflejan los resultados relacionados en este estudio, posiblemente por el tipo de análisis y selección de las variables.

VII.2.9. COMPORTAMIENTO DE VARIABLES DE CALIDAD DE ESPERMATOZOIDES PRE Y POST-CONGELADO Y DE PROTEÍNAS DE TOROS DE MAYOR Y MENOR PROMEDIO ASOCIADAS A LA FERTILIDAD *IN VIVO*.

Una de las inquietudes de los investigadores es la generación de indicadores de alta confiabilidad para definir características que muestren las bondades o defectos de un semental. En este sentido, el análisis realizado entre los toros con mayor y menor expresión relacionados con su eficiencia reproductiva entre la misma raza San Martinero y entre razas San Martinero y Cebú, sugiere que las respuestas obtenidas dentro de la misma raza no dejan evidencia de puntos de proteína que expliquen en forma confiable la participación de proteínas entre los toros de mejor y menor promedio. Esta respuesta podría estar dada por la gran homogeneidad de los toros en el estudio. Por otra parte cuando los mejores toros San Martinero se comparan con los toros de menor respuesta de la raza Cebú, resalta un punto de proteína que identifican las mayores concentraciones en los toros de mayor fertilidad como lo es la A2301, de peso molecular 16.74 kDa y punto isoeléctrico 4.78, identificada como una posible BSP A1, la cual está reportada como una proteína del componente del plasma seminal y secretada por las vesículas seminales que se adsorben a la superficie del espermatozoide en la eyaculación y tienen como función intervenir en la preservación de la

fertilidad del espermatozoide. Además de este punto, se observan 2 puntos que sobresalen significativamente en los toros seleccionados como de menor fertilidad y son los puntos de proteína A4113 y el punto de proteína A4119. Esta respuesta podría ser interpretada como proteínas que están ligadas a la baja eficiencia de la fertilidad o como proteínas que más se expresan a nivel general en la raza Cebú. Es importante señalar que en el toro San Martinero la concentración de la A4119 fue menor que en el Cebú; sin embargo esta proteína se correlacionó en forma directa con viabilidad espermática, respuesta que podría indicar que a bajas concentraciones juega un papel importante en la calidad espermática significativa y altamente significativa entre las razas. Con respecto a la época seca, en esta época, el mapa electroforético en San Martinero expuso 52 puntos de proteína, de los cuales 51 estuvieron presentes en las dos épocas, un punto de proteína propio de la época seca y 13 puntos de la época lluviosa.

La eficiencia reproductiva de los toros San Martinero para la época de lluvias en términos de indicadores de Calidad espermática, fecundación *in vitro* y efecto en el desarrollo embrionario vistos en forma integrada permite predecir la fertilidad *in vivo*. Los valores de estos indicadores no generaron grandes cambios por efecto de la época (seca o lluviosa), pero si superan a los indicadores de eficiencia reproductiva de toros reproductores de la raza Cebú Brahman. Resultados que permiten inferir que esta raza descendiente de España, se encuentra adaptada a las condiciones del trópico bajo Colombiano.

Los cambios de las variables estudiadas que determinan la calidad espermática de los toros por efecto de las proteínas plasmáticas son respuesta de la participación en forma de cluster que integra bajo un modelo de predicción proteínas con y sin cambios significativos y no en forma independiente. En este estudio reconocimos algunos modelos cuya asociación explican en gran forma el comportamiento de las variables de calidad seminal (Volumen seminal, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermáticas), del ICE y producción de espermatozoides, fertilidad *in vitro* y producción de blastocisto en función de la raza, la época climática, o de acuerdo a si se trata de la influencia del semen fresco o descongelado.

La investigación realizada permitió identificar que la proteína A2301 de peso molecular 16.74 kDa y pI 4.78 se asocia con los toros seleccionados como de mayor fertilidad, mientras que la A4113 y A4119 de pesos moleculares 15.37 y 15.49 kDa y pI de 5.38 y 5.15 respectivamente se relacionó con los toros de baja fertilidad.

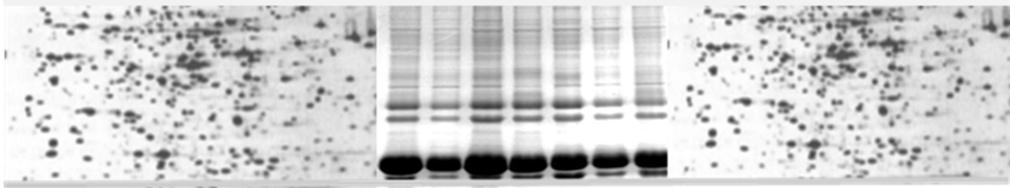
AVANCE, RECOMENDACIONES Y ESPECTATIVAS FUTURAS

La investigación realizada generó información base sobre mapas electroforéticos de puntos de proteínas del plasma seminal referenciales y, mediante modelos de predicción, señaló y resaltó la acción de posibles puntos de proteínas en forma de cluster que podrían estar generando efecto sobre los indicadores de eficiencia reproductiva. De igual forma permitió

seleccionar algunos puntos que posiblemente estén asociadas con los toros de mayor y menor fertilidad. El siguiente paso a seguir estaría encaminado a:

- La secuenciación de las proteínas que forman parte de los diferentes cluster para establecer si existen o no referencias sobre las mismas que permitan definir de mejor forma su acción dentro del proceso de fecundación con miras a clonarla y a producirlas en sistemas biológicos para su posterior utilización.
- La presencia de cluster de proteínas relacionadas con los aspectos de la capacidad fecundante del reproductor conlleva a plantear la realización de nuevas investigaciones tendentes a probar su acción biológica que permitan la identificación de biomarcadores moleculares para predecir la fertilidad y su posible utilización en los protocolos de fecundación *in vitro* e *in vivo*, y para la selección de toros a temprana edad con apoyo de la proteómica.
- Los resultados encontrados en este estudio ameritan realizar nuevas investigaciones que permitan aclarar la función de cada una de estas proteínas. También se pueden considerar en estudios para mejorar la eficiencia de los procesos *in vitro*.

VII. CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

La electroforesis unidimensional de las proteínas del plasma seminal evidenció la presencia de 13 bandas de proteína en Sanmartinero y 12 en Cebú Brahman, durante la época lluviosa. Diez de estas bandas se encontraron en ambas razas, dos se presentaron solo en Sanmartinero y una exclusivamente en el Cebú. En el plasma seminal del Sanmartinero se detectaron 16 bandas en la época de sequía, tres más que en la época lluviosa.

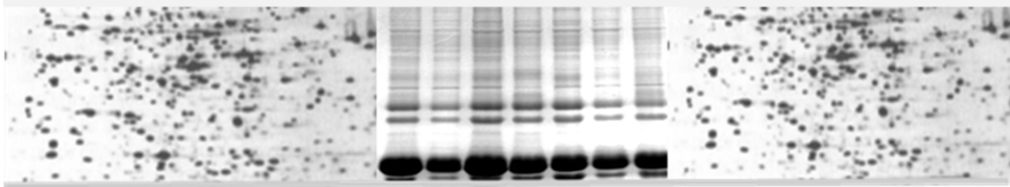
El estudio permitió la generación del Mapa referencial electroforético 2D identificado y caracterizado de puntos de proteína seminal del ganado criollo San Martinero y Cebú Brahman bajo condiciones del trópico bajo Colombiano, piedemonte llanero para la época de lluvias. Identificamos para las dos razas 64 y 37 puntos de proteína, 35 presentes en las dos razas, 2 puntos propios de la raza Cebú, los puntos isoeléctricos a nivel general oscilaron entre 3.59 y 9.8 y detectamos además puntos de proteína que difieren en su concentración significativa y altamente significativa entre las razas. Con respecto a la época seca, en esta época, el mapa electroforético en San Martinero expreso 52 puntos de proteína, de los cuales 51 estuvieron presentes en las dos épocas, un punto de proteína propio de la época seca y 13 puntos de la época lluviosa.

La eficiencia reproductiva de los toros San Martinero para la época de lluvias en términos de indicadores de Calidad espermática, fecundación *in vitro* y efecto en el desarrollo embrionario vistos en forma integrada permite predecir la fertilidad *in vivo*. Los valores de estos indicadores no generaron grandes cambios por efecto de la época (seca o lluviosa), pero si superan a los indicadores de eficiencia reproductiva de toros reproductores de la raza Cebú Brahman. Resultados que permiten inferir que esta raza descendiente de España, se encuentra adaptada a las condiciones del trópico bajo Colombiano.

Los cambios de las variables estudiadas que determinan la calidad espermática de los toros por efecto de las proteínas plasmáticas son respuesta de la participación en forma de clúster que integra bajo un modelo de predicción proteínas con y sin cambios significativos y no en forma independiente. En este estudio reconocimos algunos modelos cuya asociación explican en gran forma el comportamiento de las variables de calidad seminal (Volumen seminal, concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermáticas), del ICE y producción de espermatozoides, fertilidad *in vitro* y producción de blastocisto en función de la raza, la época climática, o de acuerdo a si se trata de la influencia del semen fresco o descongelado.

La investigación realizada permitió identificar que la proteína A2301 de peso molecular 16.74 kDa y pl 4.78 se asocia con los toros seleccionados como de mayor fertilidad, mientras que la A4113 y A4119 de pesos moleculares 15.37 y 15.49 kDa y pl de 5.38 y 5.15 respectivamente se relacionó con los toros de baja fertilidad.

VIII. CONCLUSIONS



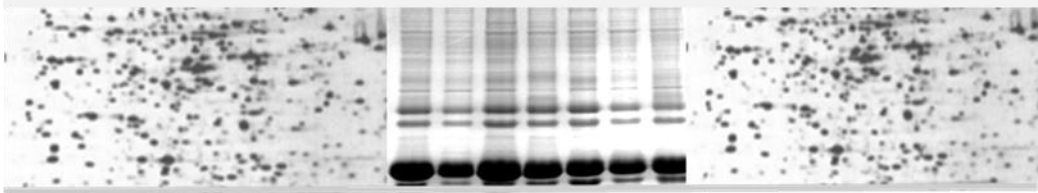
VIII. CONCLUSIONS

1. The unidimensional electrophoresis of seminal plasma proteins revealed the presence of 13 protein bands in San Martinero bull and 12 in Zebu Brahman during the rainy season. Ten of these bands were found in both races, two were presented only in San Martinero and one exclusively in Zebu. In the seminal plasma of San Martinero, 16 bands were detected in the dry season, three more than in the rainy season.

The study allowed the first generation of electrophoresis referential 2D map, where points of seminal plasma proteins were identified and characterized from San Martinero criollo cattle and Zebu Brahman under tropical conditions in the Colombian Llanos foothills. For the rainy season, 64 protein spots for San Martinero race and 37 points for Zebu were found, 35 of which were present in both races and two of which were present only in Zebu. The isoelectric points ranged, at a general level, between 3.59 and 9.8. Furthermore, protein spots were detected which differ in their concentration between races. With respect to the dry season, the San Martinero electrophoretic map expressed 52 protein spots, 51 of which were present in both seasons; one point of protein was only seen in the dry season and 13 points only in the rainy season.

2. The research allowed demonstrating the reproductive efficiency of San Martinero bulls for the rainy season, in terms of indicators of sperm quality, *in vitro* fertilization and embryo development, which give an integrated predictive value of *in vivo* male fertility. The values of these indicators in San Martinero race did not produce major changes due to the time (dry or wet), but they exceed reproductive efficiency indicators of breeding bulls of Brahman Zebu. These results let us infer that this breed, coming from Spain, is adapted to tropical conditions of Colombia.
3. The changes of the studied variables that determine the sperm quality of the bulls by the effect of the plasma proteins are the response for their participation in a cluster manner and not in an independently manner, that integrates, under a prediction model, proteins with and without significant changes. In this study, some models were recognized whose association explains the behavior of variables that account for semen quality (seminal volume, concentration, motility, viability and sperm morphology), SQI and sperm production, depending on the race, the climatic season, or according to whether it is fresh or frozen-thawed sperm.
4. The protein A2301, with molecular weight 16.74 kDa and pI 4.78, is associated with the bulls selected as the most fertile, while A4113 and A4119, with molecular weights 15.37 and 15.49 kDa and pI of 5.38 and 5.15, respectively, were related to low fertility bulls.

IX. BIBLIOGRAFÍA



IX. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal Y., y Vanha-Perttula T. (1987) Effect of secretory particles in bovine seminal vesicle secretion on sperm motility and acrosome reaction. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 79, no. 2, pp. 409–419

Ahuja C., Montiel F., Pérez P., y Gallegos J. (2009). Medio alternativo para la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Zootecnia Tropical*, 27(3).

Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., van Duin, M. and Ahmad, K. (1995a). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell Sci.* 108, 2017-2025.

Aitken R.J. (1995b). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*; 7: 659–68

Aitken R.J., Nixon B., Lin M., Koppers A.J., Lee Y.H., Baker M.A. (2007) Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* Jul;9(4):554-64.

Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 334–346

Amann R. P., Seidel G.E., Mortimer R.G. (2000). Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*. 54(9): 1499-515.

Amari, S., Yonezawa N., Mitsui S, Katsumata T., Hamano S., Kuwayama M, Hashimoto, Y. Suzuki A., Takeda Y. y Nakano M. (2001). Essential role of the nonreducing terminal α -mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol. Reprod. Dev.*, 59(2): 221-226

Bibliografía

Andrews, J. and Bavister, B.D. (1989) Hamster zonae pellucidae cannot induce physiological acrosome reactions in chemically capacitated hamster spermatozoa in the absence of albumin. *Biol. Reprod.*, 40, 117±122

Arlotto T., Schwartz J.L., First N.L., Leibfried M.L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:943-956.

AsoCebú (2008). Ganado Brahman: Orgullo Nacional en el siglo XXI .Revista EL CEBÚ. No 363 Julio-Agosto Asocebu.com

AsoCebú (2010). Fertilidad: mas rentabilidad en el Cebú. Revista EL CEBÚ. No 375 Julio-Agosto Asocebu.com

Asquith K.L., Baleato M. McLaughlin, Nixon B. and Aitken J. (2004)Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of Cell Science* 117, 3645-3657

Assumpção I. Fontes W., Sousa M.V. and Ricart C.(2005).Proteome Analysis of Nelore Bull (*Bos taurus indicus*) Seminal Plasma. *Protein & Peptide Letters*, Volume 12, Number 8.

Austin CR.(1951) Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)*;4:581–596.

Avilés M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J, Kan FW. (1997) Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol Reprod.* ;57(5):1155-63.

Aviles M., Velasquez JG., Canovas S., Barajas DP., Marcos j, Jimenez-movilla M, Gutierrez Gallego R. (2007). Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Molecular reproduction and development* issn: 1098-2795 ed: v.74 fasc.n/a p.617 - 628

Avilés M., Okinaga T., Barry D., Shur, J., Ballesta J. (2000). Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida.

Molecular Reproduction And Development ISSN: 1098-2795 ed: v.57 fasc.N/A p.296 - 308

Avilés M., Alfonso Gutiérrez-Adán A., Coy P. (2010.) Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? .Mol. Hum. Reprod. 16 (12): 896-906

Ax, Roy (2008). Seminal proteins as fertility markers (Proceedings) ReproTec .CVC Porceeding.

Baas JW., Molan PC., Shannon P. J (1983). Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. Reprod Fertil; 68:275–80

Bains R., Adeghe J. & Carson RJ. (2002). Human sperm cells express CD44. Fertility and Sterility 78 307–312

Baker T.G. (1982). Oogenesis and ovulation in reproduction in mammals Book 1: Germ cell and fertilization 17-45

Baldi E., M, Bonaccorsi I, M, G. (2000). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. Front biosci. nov 1;5:e110-23.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L. and Forti, G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 53, 121-131.

Bamba, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright

field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29:1245-1251.

Bañuelos-Valenzuela R., Sánchez-Rodríguez S. (2005). La Proteína de estrés calórico Hsp70 funciona como un indicador de adaptación de los Ganados a las zonas áridas. *Revista electrónica de veterinaria. Redvet* Issn 1695-7504. Vol VI

Bao, S., Miller, D.J., Ma, Z., Wohltmann, M., Eng, G., Ramanadham, S., Moley, K., Turk, J.(2004). Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 279, 38194–38200.

Barajas DP., Coy P, Velásquez JG, Rueda F, Herrera R, Cardozo JA. (2009). Proteínas del plasma seminal asociadas con la fertilidad de toros criollos Sanmartinero y Cebú en condiciones del trópico colombiano. *Memorias Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe. Pucón-Chile. SIRGELAC.*153-154.

Baraja-Vázquez G., Baldwin-sevilla C., Barbosa C., Sánchez-Rodríguez S. (2005). He heat shock proteins 60, 70 and 90 participate in the adaptation of goats to the arid zones. *Revista Electrónica de Veterinaria Redvet.* Vol VI.

Barrios B., Fernández-Juan M., Muíño-Blanco T., Cebrián-Pérez JA. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. *J. Androl.* 26: 539 –549.

Barrios B., Perez R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muino-Blanco T., et al., (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod;*63:1531–7

Barth A., Bo G., Tribulo H.(2000). Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad católica de Córdoba, 3–10, 55 p.

Bibliografía

Barth A., Bull B., Thundathill and Mapletoft R. J. (2003). Importancia de la calidad seminal y el uso de FIV para el estudio de efectos espermáticos Memorias V Simposio Internacional de Reproducción Animal - INRA pag. 205-221.

Bedford, J.M. & Cooper, G.W. (1970). Membrane fusion events in the fertilization o vertebrate eggs. En: Membrane Fusion. Poste, G. & Nicholson, G. L. (eds). Amsterdam: Elsevier. pp. 65–125.

Bedford JM. (2011) .Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. ;108(12):4703-4.

Beere H.M. (2004). The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. Journal of Cellular Science, 117(Pt 13), 2641-51.

Beker ARC.L, Colenbrander B., Beversf MM. (2002). Effect of 17 β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. Theriogenology 58: 1663-1673.

Bellin M.E., Oyarzo J. N., Hawkins H. E., Zhang, H. . Smith R. G, Forrest D. W. (1998). Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. J Anim Sci 76:2032-2039.

Bergeron A., Villemure M., Lazure C., Manjunath P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. Mol Reprod Dev. Aug;71(4):461-70.

Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A. & Gagnon, C.(2000) Levels of antioxidant defenses are decreased inbovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.Molecular Reproduction and Development 55, 282–288.

Bibliografía

Bjellqvist B., Righetti PG., Gianazza E., Gorg A., Westermeier R and Postel W.(1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients:principle, methodology and some aplikations. J Bicochem Biophys methods 6, 317-339

Bonet, S, Briz, M.D. (1991) New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. Theriogenology 35:725-730.

Boni R., Tosti E., Roviello S., Dale B. (1999). Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. Biol Reprod 61:1050±1055.

Bosch P, De Avila JM, Ellington JE, Wright RW. (2001). Heparin and Ca²⁺-free medium can enhance release of bull sperm attached to oviductal epithelial cell monolayers. Theriogenology. 56, 247-260

Bosch, P., Wright Jr. (2005). The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. Arch. med. vet., Valdivia, vol. 37, n.2. 95-104.

Brackett, B.G., Bousquet D., Boice M.L, Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27: 147-15.

Brandon C I., Heusner G L., Caudle A B., Fayrer-Hosken R A., (1999). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. Theriogenology, 52(5):863-73.

Breitbart H., Spungin B.(1997). The biochemistry of the acrosome reaction. Molecular Human Reproduction, vol. 3, no. 3, pp. 195–202

Brewis I.A., Gadella B.M. (2010). Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod.* 16(2):68-79

Brown LF., Berse B., Van De Water L., Papadopoulos-Sergiou A., Perruzzi CA., Manseau ej, Dvorak HF, Senger DR. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, v.3, p.1169-1180.

Bucak MN, Başpınar N, Tuncer PB, Coyan K, Sariözkan S, Akalın PP, Büyükleblebici S, Küçükğünay S.(2012). Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia.* May;44 Suppl 1:102-9.

Buhi W.C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen dependent glycoprotein. *Reproduction* 123, 355-362.

Burkart AD, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M, Dean J.(2012) Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol.* ;197(1):37-44.

Burkman LJ, Overstreet JW, Katz DF. (1984). A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *J Reprod Fertil* 71, 367-376

Burns BM, Gazzola C, Holroyd RG, Crisp J, McGowan MR (2011). Male reproductive traits and their relationship to reproductive traits in their female progeny: a systematic review. *Reprod Domest Anim.* ;46(3):534-53.

Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, González-González ME, Galicia-Chavarría M, Larrea F, Gerton GL.(2006). Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod.* ;74(4):760-8.

Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, del Olmo D, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM.(2012) Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Domest Anim.* 47 Suppl 3:12-21

Caballero J, Frenette G, Sullivan R. (2010). Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Vet Med Int Oct* 13;2011:757194.

Calvete JJ., Campanero-Rhodes A., Raida M. and Sanz L. (1999) Characterization of the conformational and quaternary structure-dependent heparin binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Lett* 444,260–264.

Calvete JJ., Raida M., Sanz L., Wempe F., Scheit, K.-H., Romero, A. & Topfer-Petersen, E. (1994) Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109. Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa, *FEBS Lett.* 350, 203-206

Calvete JJ., Raida M., Sanz L., Wempe F., Scheit KH., Romero A., Esch FS,, Ling NC., Bohlen P., Ying SY., Guillemin R. (1996)a. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *FEBS Lett* 399:147-152.

Calvete JJ., Mann K., Sanz L., Raida M., Topfer-Petersen E. (1996)b. The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma. *FEBS Lett;* 399:147–152.

Calvete JJ., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Töpfer-Petersen E. (1997). Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett.* 407; 201-206.

Bibliografía

Camargo O., Ruiz T., Olivera M. (2008). Theoretical Model For Explaining Accumulation Of Fat Drops In In Vitro Produced Bovine Embryos. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No. 2, 89 – 102.

Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J. (1997). Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 57(6):1293-301.

Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J. (1999). Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod.* 60(2):454-60.

Cánovas S, Coy P. (2008) Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion. *Rev Invest Clin.*60(5):403-13.

Cánovas S., Romar R., Gullón L., Avilés M. Coy P. (2009). Pre-fertilization zona pellucida hardening by different cross-linkers affects IVF in pigs and cattle and improves embryo production in pigs. *Reproduction.* 137: 803–812

Carbonaro M. (2004) Proteomics: present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology* 15 209-216. 9.

Cardozo JA., Fernandez-Juan M., Forcada F., Abecia A., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez JA. (2006a). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 66(4): 841- 850

Cardozo JA. (2006b). Identificación mediante electroforesis bidimensional de proteínas del plasma seminal ovino capaces de proteger de los daños del frío. Tesis Doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de veterinaria. Universidad de Zaragoza-España.

Bibliografía

Cardozo J.A., Grasa P., Muiño M.T. Cebrián J.A. (2009). Effect of seminal plasma proteins at freezing on ram sperm motility and viability. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10(1), 51-59

Castellini C. Dal Bosco A., Ruggeri S., Collodel G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertil Steril.* Jul;96(1):24-7.

Chacur M., Castillo A., Godoy G., Gandolfo V., Machado N.,Kronka S., Guaberto, M. (2011). Influência da estação sobre as proteínas do plasmasesminal na raça tabapuã (bos taurus indicus)season influence on the seminal plasma proteins in tabapua breed (bos taurus indicus). *Arch. Zootec.* 60 (230): 301-304.

Chandonnet L, Roberts K.D. (1990). Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma..*Molecular Reproduction Development.* 26 (4) 313-8

Chang MC. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* .168:697–698.

Chang MC, Austin CR, Brown J. (1976). Mammalian fertilization. *Res Reprod.* ;8(4)

Chen H., Cheung MPL., Chow P.H., Cheung A.L.M., Liu W., O W.S.(2002). Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction* 124:491–499.

Chian R.C., Sirard M.A. (1995). Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* 52: 156-162

Cohen D., Ellerman D., Cuasnicu P. (2000). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod;* 63:462-468.

Comizzoli P., Urner F., Sakkas D. and Renard J. P. (2003). Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the s phase in bovine zygotes. *Biol. Reprod.* 68,1934 -1940.

Concha Gil García. (2003). La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. *Rev Actualidad SEM.*

Cook SP., Brokaw CHA., Muller CH., Babcock D. (1994). Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Dev Biol* 165:10-19.

Cooper T.G. (2007).Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem *Asian Journal of Andrology* 9, 533–539

Coppola G. (2006). Increased Levels of C-Reactive Protein and Fibrinogen Influence the Risk of Vascular Events in Patients with NIDDM: *International Journal of Cardiology* 106(1):16-20.

Cormier N, Bailey JL. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* Jul;69(1):177-85.

Cormier N., Sirard M., Bailey JL. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*; 18:461-468.

Coy P. and Avilés M. (2010) What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol. Rev.* 85, pp. 593–605. 593.

Bibliografía

Coy P., Cánovas S., Mondéjar I., Saavedra MD., Romar R., Grullón L., Matás C., y Avilés M. (2008b). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. PNAS Vol. 105 no. 41: 15809–15814.

Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M.(2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. Reproduction. 144(6):649-60.

Coy P., Grullon L., Canovas S., Romar R., Matás C., Avilés M. (2008a). Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. Reproduction 135: 19–27.

Coy P, Romar R. (2002) In vitro production of pig embryos. A point of view. Reproduction Fertility and Development 14:275-286.

Coy P., Romar R., Ruiz S, Canovas S., Gadea J., Garcia-Vazquez F., MatasC. (2005). Birth of piglets after transferring of in vitro-produced embryos pre-matured with R-roscovitine. Reproduction 129:747–755

Davalieva K., Kiprijanovsa S., Noveski P., Plaseski T., Kocевs B., Broussard C., Plaseska-Karanfilska D.(2012) Proteomics analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. Andrología (a paraitre)

Dean J.(2004). Reassessing the molecular biology of sperm–egg recognition with mouse genetics. BioEssays. 26: 29–38

Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR.(2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. Annu Rev Pharmacol Toxicol. ;41:723-49

Desnoyers L, Manjunath P. (1992). Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* 267: 10149–10155

Desnoyers L, Thérien I, Manjunath P.(1994) Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Mol Reprod Dev. ;37(4):425-35.

Dostal J., Veselsky L., Marounek M., Zelezna B. and Jonakova V. (1997) Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. *J Reprod Fertil* 111, 135–141.

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

Du Plessis SS, Kashou AH, Benjamin DJ, Yadav SP, Agarwal A. (2011). Proteomics: a subcellular look at spermatozoa. *Theriogenology.* Mar 1;77(4):738-765.e52.

Du Preez JH, Hattingh PJ, Giesecke WH, Eisenberg BE.

Onderstepoort (1990) .Heat stress in dairy cattle and other livestock under southern African conditions. III. Monthly temperature-humidity index mean values and their significance in the performance of dairy cattle. *J Vet Res.* Dec;57(4):243-8

Duque, P., Gómez, E., Díaz, E., Facal, N.,Hidalgo, C., Díez, C. (2003a). Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology.* 59: 889-899

Duque P., Hidalgo C., Gómez E., Pintado B, Facal N., Díez C.(2003b). Macromolecular source as dependent on osmotic . pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo

development and quality. *Reprod Nutr Dev* 43,487-496

Ecroyd H, Asquith KL, Jones RC, Aitken RJ. (2004) The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent. *Dev Biol.*;268(1):53-63.

Eddy, E., Clark, J. y Fenderson B. (1981).Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Res.* 4: 333-362

Eliasson, R. y Treichl, L. (1971). Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 22:134-137.

Erikson D. W., Way A. L, Chapman D. A., Killian G. J. (2007). Detection of Osteopontina on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization, *Reproduction*, vol. 133, no. 5, pp. 909–917

Esch F.S, Ling N.C, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. (1983). Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 113:861-867

Esponda P. (1985) Spermiogenesis and spermatozoa in mammals. *Revis Biol Celular*;6:1-99.

Fair T., Hyttel P. y Greve T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 437–42

Fan J., Manjunath P. (2006). Bovine seminal plasma proteins and their relative a new expanding superfamily in mammals.. *Gene* vol. 375, 21 Pag. 63-70

Farin PW., Crosier AE. (2001). Influence of in vitro system on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55,151-170

Fedegan, Oficina de investigaciones económicas (2010). Cifras de Referencia Plan Estratégico de la Ganadería Colombiana PEGA 2019.

Ferguson E.M., Leese H.J.(1999). Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.* 116, 373–378.

Fernández-Juan M., Gallego M., Barrios B., Osada J., Cebrián-Pérez JA., Muiño-Blanco T. (2006). Immunohistochemical Localization of Sperm-Preserving Proteins in the Ram Reproductive Tract. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 4.

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

Florman H. and Storey B.(1982). Characterization of Cholinomimetic Agents that Inhibit In Vitro Fertilization in the Mouse. *Journal of Andrology* 3: 157-164

Fouladi-Nashta AA, R Alberio, M Kafi, B Nicholas, KHS

Campbell, R Webb. (2005). Differential staining combined with TUN L labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 497-502

Franken DR, Oehninger S (2012). Semen analysis and sperm function testing. *Asian J Androl.* 2012 Jan;14(1):6-13. doi: 10.1038/aja.2011.58. Epub 2011 Dec 19.

Frenette G., Sullivan R. (2001). Prostasome -hyphen;like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development.* Volume 59, Issue 1, pages 115–121

Fukui, Y., Kikuchi, Y., Kondo, H. and Mizushima, S. (2000) Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology*, 53, 1553±1565.

Fukui Y, Ono H (1989). Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.*;86(2):501-6.

Funahashi H., Asano A., Fujiwara T., Nagai T., Niwa K., Fraser LR. (2000). Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev.* Jan;55(1):117-24.

Gabler C., Chapman DA. & Killian GJ. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 126 721–729.

Gabay C, Kushner I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England J Med* 340; 6: 448-454.

Gadea Mateos J. (2002). Manual básico de laboratorio de semen Departamento de fisiología. Facultad de veterinaria. Universidad de Murcia.

Gadea, J., Selles, E., Marco, M. A., Coy, P., Matas, C., Romar, R. & Ruiz, S. (2004) Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690–701.

Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. (2010) Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science.* ;329(5988):216-9

Gandolfi, F., R.M. Moor. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 81(1):23-28.

García-Vazquez FA, Gutierrez-Adan A., Gadea J. (2009). Evaluación de la unión espermatozoide-ADN exógeno en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *Archivos de Medicina Veterinaria.* 41.131-138

Gardner DK., Lane M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 13,148-159

Gardner D.K., Lane M., Spitzer A. y Batt. P.A. (1994). Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol. Reprod.*, 50: 390-400.

Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.*;286 (3):433-42.

Garrido, C., S. Gurbuxani, L. Ravagnan, and G. Kroemer. (2001). Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 286:433-442.

Gasset M., Saiz J.L., Laynez J., Sanz I., Gentzel M., Topfer-Petersen E. and Calvete J. (1997). Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *European Journal of Biochemistry.* Volume 250, Issue 3, pages 735–744

Gatti J.L., Castella S., Dacheux F., Ecroyd H., Métayer S., Thimon V., Dacheux J.L.(2004) .Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci.*; 82-83:321-39.

Gaviraghi A., Deriu F., Soggiu A., Galli A., Bonacina C., Bonizzi L., Roncada P.(2010). Proteomics to investigate fertility in bulls. *Vet Res Commun.*; 34 Suppl 1:S33-6.

Georgopoulos, C. , Welch, W. J. (1993).Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 9:601-34.

Gerena, R.L., Irikura D., Eguchi N., Urade Y., y Killian G.J. (2000). Immunocytochemical Localization of Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in the Bull Testis and Epididymis and on Ejaculated Sperm. *Biology of Reproduction.* 62, 547–556

Gerena RL., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman DA., Killian GJ. (1998). Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of reproduction*, 58(3):826-833.

Ghosh L.,Datta K. (2003). Sperm surface hyaluronan binding protein (HABP1) interacts with zona pellucida of water buffalo (*Bubalus bubalis*) through its clustered mannose residues. *Molecular Reproduction and Development.* Volume 64, Issue 2, pages 235–244

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. *Biology of Reproduction*, vol. 78, no. 5, pp. 921– 931

Gjorret JO., Avery B., Larsson L-I., Schellander K., Hyttel P. (2001). Apoptosis in bovine blastocysts produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 55:321

Bibliografía

Gonçalves RF., Wolinetz CD., Killian GJ. (2007). Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alpha(V) and alpha(5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v.67, p.468-474.

Gomendio M., Cassinello J., Roldan E R. (2000) .A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc Biol Sci.* 267(1446): 875–882.

Gómez E, D Diez. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Anim Reprod Sci* 58,23-37

Goodman R., Blank M. (1998). Magnetic Field Induces Expression of hsp70. *Cell Stress and Chaperones* 3:79-88.

Gordon, I. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos. Pág. 113-114, CAB international,

Goudet G., Mugnier S., Callebaut I., Monget P. (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biol Reprod*;78:796-806.

Graybill, F. A. (1961). An Introduction to Linear Statistical Models, Vol. I, McGraw-Hill.

Greeve T., Xu K. P., Callesen H. and Hyttel P.(1987) In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics* Volume 4, Number 5, 281-285

Greube A., Müller K., Töpfer-Petersen E., Herrmann A. and Müller P. (2001). Influence of bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 40,8326–8334.

Gross VS, Wessel G, Florman HM, Ducibella T. (2000). A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. *Biol Reprod.* 63(2):575-81.

Gutiérrez-Adan A, Lonergan P., Rizo D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, De la Fuente J. (2001). Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 55:1117-1126.

Gutiérrez-Adan A. (2005). Developmental consequences of sexual dimorphism for gene transcription during preimplantation embryonic development. The Society for the Study of reproduction –SSR. 38th Annual Meeting: Quebec City. Quebec, Canada. MS

Gwathmey TM, Ignatz GG, Suárez SS. (2003). PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 69, 809-815.

Gwathmey TM, Ignatz G, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. (2006) Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 75:501-507

Gwatkin,R.B., Williams,D.T., Hartmann, J.F. & Kniazuk, M. (1973). The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *Journal of Reproduction and Fertility* 32, 259–265.

Gwatkin,R.B.& Williams, D. T. (1974). Heat sensitivity of the cortical granule protease from hamster eggs. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 153–155.

Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, Kuiper H, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T.(2005) Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene.* 6;352:20-9.

Hafez E.S.E. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. 7ª edición.

Hamano, S., Kuwayama, M. (1993). In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: a comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. Vol. 39, pp. 703-712.

Hammerstedt RH. (1993). Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev.*;5(6):675-90.

Hammerstedt R.H., Graham JK., Nolan JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal of Andrology* .11(1): 73-88.

Hammond DS., Wang S., Holyoak GR. (2000). Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 59,23-30

Hansen PJ. (1997). Effects of environment of bovine reproduction. In: Youngquist RS (Ed). *Current therapy in large animal* .Theriogenology. WB Saunders, Philadelphia, PA, 403-415

Hansen, P.J. (2004). Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science* 82-83:349-360

Hansen P.J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364, 3341-3350

Harti FU. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381:571-580

Harrison, R. A. P., Vickers S. E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 88(1): 343-352.

Harshan HM, Sankar S, Singh LP, Singh MK, Sudharani S, Ansari MR, Singh SK, Majumdar AC, Joshi P. (2009) Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Anim Reprod Sci.* ;115(1-4):306-11

Harvey AJ. (2007). The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 98: 113–128.

Heise A., Kähn W., Volkmann D H, Thompson P N, Gerber D. (2010) Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa .*Animal Reproduction Science* .

Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L. (2000). Chaperone in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*, **33**, 341–365.

Henault MA., Killian G.J. (1996). Effect of homologous and heterologous seminal plasma on the fertilizing ability of ejaculated bull spermatozoa assessed by penetration of zona-free bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility.* 108(2):199-204

He Z, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg J, Primakoff P, Myles D (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev Biol*; 254:226-237.

Henault MA., Killian G.J., Kavanaugh JF., Griel LC., Jr. (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.

Hernández, B.G. (1981). Las razas criollas colombianas para la producción de carne. Recursos Genéticos animales en América Latina. Ganado criollo y especies de altura. Roma, Italia, FAO:22:52.

Herradón PG., Quintela, LA., Becerra JJ., Ruibal S. y Fernández M. (2007). Fecundación In vitro: Alternativa para la mejora genética en GANADOS. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú. Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1).

Hidalgo C., Tamargo C., Díez C. (1995). Análisis del semen ganado. Tecnología Agroalimentaria. Boletín informativo Serida -n.º 2.

Hodbohoy T. and Talbot (2001) Characterization fate and function of hámster granules componentes. Molecular reproduction and development. 58. 223-235.

Ho HC, Granish KA, Suarez SS. (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. Dev Biol. Oct; 250(1):208-17.

Holdridge L.R. y Hunter J.R. (1961) Clave de las asociaciones climáticas naturales del mundo y guía para el uso de la tierra en los trópicos. Suplemento. Academia Colombiana de Ciencias. 9(43):1- 14.

Holm P., Booth P.J., Schmidt M.H., Greve T. y Callesen H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOF, a medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology, 52(4): 683-700.

Holm P., Booth PJ., Callensen H. (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro- derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. Reproduction 123,553-56

Holt V. & Van Look, K. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127(5):527-35

Hulinska P., Martecikova S., Jeseta M., Machatkova M. (2011) Efficiency of in vitro fertilization is influenced by the meiotic competence of porcine oocytes and time of their maturation. *Animal Reproduction Science*. Volume 124, Issue 1, Pages 112-117.

Hunter A.G., Moor R.M. (1987). Stage-dependent effects of inhibiting ribonucleic acids and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. *J. Dairy Sci.* 70, 1646–16.

Hunter R.H., Coy P., Gadea J., Rath D. (2011). Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization. *J Assist Reprod Genet.* [Epub ahead of print].

Hunter RHF. (1984). Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory distribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil* 72, 203-211.

Hunter RH F. (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev* 44, 417-422.

Hunter RHF. and Wilmot I. (1984) Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev.* 24,597–608.

Hunter RH F., Nichol R. (1986). A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertility.* 77, 599-606.

Hunter, R.H.F., Wilmot, I. (1983). The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 167-173.

Hyttel P., Xu K.P., Smith S., Greve T. (1986). Ultrastructural of in vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78, 615-625

Hyttel P., Callesen H., and Greve T. (1989). A comparative ultrastructural study of in vivo versus in vitro fertilization of bovine oocytes. *Anatomy and embryology*. Volume 179, Number 5, 435-442.

Ibrahim N.M., Gilbert GR., Loseth KJ., Crabo BG. (2000). Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *J Androl*, v.21, p.887-894.

Ibrahim, N.M. (1999). Reproductive Tract Secretions and Bull Spermatozoa contain different clusterin Isoforms that cluster cells and inhibit Complement-induced Cytolysis. *Journal of andrology*. Vol 26, p 230-240.

Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC, Ganss B, Cheifetz S (2000) Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis*. ;18(3):253-60.

Ibrahim, N. M., Romano J. E., Troedsson MH., Crabo BG. (2001). Effect of scrotal insulation on clusterin-positive cells in ram semen and their relationship to semen quality." *J Androl* 22(5): 863-77.

Ignotz GG, Lo MC, Pérez CL, Gwathmey TM, Suárez SS. (2001). Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 64, 1806-1811.

Isope, N., and Yoshimura Y. (2000) Immunocytochemical study of cell proliferation in the cystic ovarian follicles in cows. *Theriogenology* 54: 1159-1169.

Iwamoto M, Onishi A, Fuchimoto D, Somfai T, Takeda K, Tagami T, Hanada H, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T, Kikuchi K.(2005) Low oxygen tension during in vitro maturation of porcine follicular oocytes improves parthenogenetic activation and subsequent development to the blastocyst stage. *Theriogenology*. 15;63(5):1277-89.

Izquierdo-Rico MJ., Jiménez-Movilla M., Llop E., Pérez-Oliva A., Ballesta J., Gutierrez-Gallego R., Jiménez-Cervantes C., Avilés M. (2009). Hámster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4. *J Proteome Res* 2009; 8:926-941.

Jansen S, Ekhlesi-Hundrieser M, Topfer-Petersen E. (2001). Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tiss Organs* 168: 82–92.

Jansen S., Esmailpour T., Pantaleon M., Kaye L. (2006). Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. *Reproduction*. 131:469-479.

Januskauskas A., Gil J., Söderquist L., Rodríguez-Martínez H. (2000) .Relationship between sperm response to glycosaminoglycans. *Reproduction in Domestic Animals*. Volume 35, Issue 5, pages 207–212.

Jha KN, Kameshwari DB, Shivaji S. (2003) Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. ; 49(3):329-40

Jeyendran, R. S., Vanderven H. H., Zaneveld LJ. (1992). The Hypoosmotic Swelling Test - An Update. *Arch Androl* .29: 105-116.

Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi 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):4892-6.

Jiménez L. J., Bejarano M. y Martínez G C. 1996. Circunferencia escrotal y su relación con edad, peso y características seminales de GANADOS criollos San Martineros. En: Memorias del III Congreso Iberoamericano de Razas Autóctonas y Criollas. Santafé de Bogotá. 25 a 29 de noviembre de 1996.

Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Tramontina R.C. (2004). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Tehriogenology* Jun 15; 61(2-3) 255-66.

Jobim M.I.M., Macedo R., Costa Matto R. (2009). Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, Belo Horizonte, n.6, p.11-19, dez.. Disponible en www.cbra.org.br.

Johnson, LA., Dobrinsky, JR., Guthrie, HD., Welch, GR. (2000). Sex preselection in swine: flow cytometric sorting of x- and y- chromosome bearing sperm to produce offspring. *Boar. Semen Preservation IV*, Beltsville, Maryland. 107.

Jois P.S. and Manjunath P. (2010) The N-terminal part of Binder of Sperm 5 (BSP5), which promotes sperm capacitation in bovine species is intrinsically disordered *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 394, Issue 4, Pages 1036-104.

Julián M., Velásquez JG., Gutiérrez-Gallego R., Jiménez-Movilla M. Ballesta J, Coy P, Avilés M (2005). Characterization of the different sialic acids contained in the bovine zona pellucida ESDAR.

Kalab P, Peknicová J, Geussová G, Moos J. (1998) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev.*;51(3):304-14.

Bibliografía

Karja NW, Wongsrikeao P, Murakami M, Agung B, Fahrudin M, Nagai T, Otoi T. (2004) Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology*. ;62(9):1585-95.

Katsumata, T., S. Noguchi, N. Yonezawa, M. Tanokura, M. Nakano (1996). Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Eur J Biochem*, 240(2):448-53.

Katz, D.F., Drobnis E.Z., Overstreet, J.W. (1989). Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res.* 22: 443-469.

Kelly V.V., Kuy S., Palmer D.J., Xu Z., (2006). Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics*, 6, 5826-5833.

Killian,G., Chapman, D. A., Rogowski LA. (1993). Fertility-Associated Proteins in holstein bull seminal plasma. *Biology of reproduction* 49, 1202-1207.

Kochhar HPS., Peippo J. and King WA. (2001) Sex related embryo development. *Theriogenology* 55.

Kopecek P., Altmannova K., Weigl E. (2001) Stress proteins: Nomenclature, division and functions. *Biomed papers.* 145:39-47.

Kumar P., Kumar D., Singh I., and Yadav P. S. (2012) Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility REVIEW . *Agricultural research.* Volume 1, Number 1, 78-86, DOI: 10.1007/s40003-011-0006-2.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680–685.

La Falci, VS.N., Tortorella, H., Rodriguez, I., Brandelli, A. (2002) Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology*. New York, v. 57, p. 1035-1048.

Lafleur M., Courtemanche L., Karlsson G., Edwards K., Schwartz J.L. and Manjunat P. (2010). Bovine binder-of-sperm protein BSP1 promotes protrusion and nanotube formation from liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 399, Issue 3, Pages 406-41.

Lavitrano M, D French, M Zani, L Frati, C Spadafora. (1992). The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Dev* 31, 161-169.

Lavitrano M, E Maione, E Forte, M Francolini, S Sperandio, R Testi, C Spadafora. (1997). The interaction of sperm cells with exogenous DNA: A role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Exp Cell Res* 233, 56-62.

Leahy T., Gadella M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction Advance.Review* .rep-11-0310.

Leese HJ. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertility*. 82, 843-856.

Lefievre L., Conner S., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis IA., Monk M., Hughes DC., Barratt R. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod* 19:1580–1586.

Lefebvre R., Chenoweth PJ., Drost M., Leclear CL, Maccubbin M., Dutton JT, Suárez SS. (1995). Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod* 53, 1066-1074.

Lefebvre R, Lo MC , Suárez SS. (1997). Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol. Reprod.* 56, 1198-1204.

Légaré C., Gaudreault C., St-Jacques S. and Sullivan R.(1999). During epididymal transit, mammalian spermatozoa acquire new surface proteins that are necessary for gamete interaction P34H Sperm Protein Is Preferentially Expressed by the Human Corpus Epididymidis *Endocrinology* Vol. 140, No. 7, 3318-3327.

Levene, H. (1960). Robust testes for equality of variances. In *Contributions to Probability and Statistics* (I. Olkin, ed.) 278–292. Stanford Univ. Press, Palo Alto, CA. MR 0120709SS.

Liu, Z. and Foote, R. H. (1995). Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol. Reprod.*, v.53, p.786-790.

Liu, Z. and Foote, R. H. (1997). Effects of amino acids and α amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Mol. Reprod. Dev.* 46:278-285.

Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., Boland M. P. and Gordon I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37:48–53.

Lonergan P., O’Kearney-Flynn M., Boland M. (1999). Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension, *Theriogenology* 51: 1565–1576.

Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Fair MP., Boland.(2003a) Efecto del medio ambiente del cultivo sobre la calidad del embrión y la expresión genética. *Reproductive biomedicine* Vol 7 N6. 657-663.

Lonergan P., Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Moreira P.M, Pintado B., de la Fuente J., and. Boland M.P. (2003b). Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In vitro or In vivo. *Biology of reproduction* 69, 1424–1431

Lu KH., Seidel GE. (2004). Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819–830

Lusignan M-F., Bergeron A., Lafleur M., and Manjunath P. (2011). The Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Interact with Caseins and Whey Proteins of Milk Extender. *Biol Reprod.* 457-64.

Maas DH., Storey BT., Mastroianni L Jr. (1977) Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) .*Fertil Steril.* (9):981-5.

McCauley TC., Dawson GR., Oyarzo JN., McVicker J., Marks SHF., Ax RL. (2004). Developing and validating a lateral-flow cassette for fertility diagnostics in bulls. *IVD Technologies* 10(3), 35-40

McEvoy T.G., Robinson J.J., Carolan C., Staines M.E., Broadbent P.J., Sinclair K.D., (1999). Ovine fetal development following embryo culture in synthetic oviduct fluid with added ammonium. *Theriogenology* 51, 247.

Mahony M.C., Gwathmey T. (1999). Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Repro;* 60: 1239-1243.

Malmgren L.(1997) Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48(4):523-30

Mandal DK, Kumar M, Tyagi S.(2010) Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian × Sahiwal crossbred bulls. *Animal.* 4(4):595-603

Manjunath P., Sairam MR. (1987). Purification and biochemical characterization of three major acid proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J*;7:685–92).

Mann T., Lutwak-Mann C. (1981). Male reproductive function and semen. New York: Springer-Verlag, pp: 269-326

Manjunath, P., Marcel, Y. L., Uma, J., Seidah, N. G., Chretien, M., and Chapdelaine, A. (1989) Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 16853-16857

Manjunath P., Chandonnet L., Baillargeon L. and Roberts K. D. (1993) .Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *Journal of Reproduction and Fertility.* 97 75-81

Manjunath P., Soubeyrand S., Chandonnet L., y Roberts K. (1994a) Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2 *Biochem. J.* 303 (121-128)

Manjunath, P., Chandonnet L., (1994b). Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biology Reproduction* 50 (4) 977

Manjunath P., and Therien I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of reproductive immunology.* Vol 53 issues 1-2: 109-119

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.* ;65:217-22

Manjunath P., Lefebvre J., Prashanth J., Fan J. (2009)

New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biology of reproduction*. 80, 394–397

Marnet B., Vieitez G. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *Int J Androl* 23(1): 22-28.

Marquez B, Suarez SS (2007). Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biol Reprod* ;76(4):660-5.

Marengo SR. (2008). Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci. Apr*;105(1-2):52-63.

Martínez C. G.; R.R. Frahm; D.S. Buchanan y R.D. Geisert. (1993). Caracterización de la raza criolla Blanco Orejinegro (BON). III. Heterosis del comportamiento reproductivo de hembras BON, Cebú y sus cruces recíprocos. *Rev. ICA. (Col)*. 28:4 377-388.

Martínez C, G. (1995). The Colombian Criollo Cattle Breeds. In: Proceedings of the third global conference on conservation of domestic animal genetic resources. Rare breeds international; Queens University, Kingston, Ontario- Canada; 161-166

Martínez C. G. (1999). Potencial genético del ganado San Martinero en sistemas de carne y doble propósito. En: Memorias. Seminario Internacional Caracterización genética y potencial productivo del ganado San Martinero. Villavicencio, 28 de mayo. P 31-42

Martínez Heredia J., (2006). Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*, 6, 4356-4369

Martinez-Soto JC., Hourcade JD., Gutiérrez-Adán a., Landeras JL., Gadea J.(2010). Effect of Genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. Asian Journal of Andrology. 12(3):431-41.

Marquant-Leguienne B., Humblot P. (1998). Practical measures to improve in vitro blastocysts production in the bovine. Theriogenology 49,3-11

Maxwell W.M., de Graaf S.P., Ghaoui Rel-H, Evans G. (2007) .Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Soc Reprod Fertil Suppl. ;64:13-38.

Memili E., First NL. (2000) .Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. Zygote. 1:87-96.

Miller D.J., Winer M.A. (1990). Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Bio Reproduction. 42:899-915

Molloy MP. (2000). Two –dimensional electrophoresis of mebrane proteins immobilized pH gradients. Anal Biochem 280, 1-10

Monaco E., Gasparrini B., Boccia L., De Rosa A., Attanasio L., Zicarelli L., Killian G.(2009). Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle.Theriogenology. 71(3):450-7.

Montgomery D. (1991) .Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamerica.

Moore H.D., and Akhondi M.A., (1996). In vitro maturation of mammalian spermatozoa. Reviews of Reproduction 1 54-60

Bibliografía

Morales P., Vantman D., Barros D., Vigil P. (1991) Human spermatozoa selected by Percoll gradient or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction Hum. Reprod. 6 (3): 401-404.

Moreau R., Frank PG., Perreault C., Marcel YL., Manjunath P.(1999) Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. Biochim Biophys Acta. 1438(1):38-46.

Moreau R, Manjunath P.(2000) Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta. 24;1487(1):24-32.

Moreno RD, Schatten G (2000) Microtubule configurations and post-translational alpha-tubulin modifications during mammalian spermatogenesis. Cell Motil Cytoskeleton 46: 235–246.

Mortarino M., Tedesehi G., Negri A. (1998). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Electrophoresis, 19, 797-801.

Motlik, J. and J. Fulka. (1986). Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. Theriogenology 25:87.

Mountjoy JR, Xu W, Mcleod D, Hyndman D, Oko R. (2008). RAB2A: a major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. Biol Reprod 79(2): 223-232.

Moura AA. (2005). Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull: The case for osteopontin . Anim. Reprod., v.2. n.1, p.3-10.

Moura AA., Chapman D., Koc H. and Killian G., (2006a). Proteins of the Cauda Epididymal Fluid Associated With Fertility of Mature Dairy Bulls. Journal of Andrology, Vol. 27, No. 4.

Moura AA., Chapman D., Kocb H., Killian G. (2007a). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science* 98 (2007) 169–188.

Moura AA., Chapman D., Killian G. (2007b) Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. *Molecular reproduction and development* 74:214–222.

Moura A.A., Koc H., Chapman D.A., Killian G.J. (2006b) Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl.* 27(2):201-11.

Moura AA, Souza CE, Stanley BA, Chapman DA, Killian GJ (2010). Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. *J Proteomics.* ;73(10):2006-20.

Mucci N., Aller J F., Kaiser G G., Hozbor, Alberio F R H.(2006). In vitro production of bovine embryos: serum supplementation to the culture media. *Arch. Med. Vet.* 38, Nº 2.

Müller P., Erlemann K-R., Müller K., Calvete JJ., Töpfer-Petersen E., Marienfeld K. and Herrman A. (1998) Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles. *Eur Biophys J* 27,33–41.

Müller P., Greube A., Töpfer-Petersen E. and Herrmann A. (2002) Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids. *Eur Biophys J* 31,438–447.

Muñoz-Gotera RJ, Hernández-González EO, Mendoza-Hernández G, Contreras RG, Mújica A. (2001). Exocytosis of a 60 kDa protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol Reprod Dev.* 60(3):405-13.

Nagano M., Katagiri S. y Takahashi Y. (2006). Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote* 14: 53–6

Nauc V. and Manjunath P. (2000). Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of reproduction*. 63, 1058–1066

Naz RK, Rajesh PB (2004) Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* ;2:75.

Nedambale T., Dinnyés A., Yang X. , Tian XC.(2004). Bovine blastocyst development in vitro: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod.* 71:1671-167

Nedambale TL., Du F., Yang X., Tian XC. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with betamercaptoethanol. *Anim Reprod Sci.*, 93:61-75

Nichol R., Hunter RH, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. (1992). Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertility.* 96, 699-707.

Niemann H. and Wrenzycki C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 53: 21-34.

Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P.(2001) Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol.* ;233(1):204-13.

Nixon B., Aitken RJ., McLaughlin E.A. (2007). New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci*:64(14):1805-23

Novak S., Smith T.A., Paradis F., Burwash L., Dycka M.K., Foxcroft G.R., Dixon W.T. (2010). Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology*. 1;74(6):956-67. Epub 2010

Obando, C.H. 1999. Evaluación *in vitro* de la penetración espermática del semen San Martinero y Cebú (Brahman). En: Memorias. Seminario Internacional Caracterización genética y potencial productivo del ganado San Martinero. Villavicencio, 28 de mayo de 1999. P 31-42.

O'Farrell, PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.

Olivera M., Ruiz T., Tarazona A., Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fecundación. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* Vol. 19:4

Oliveira LZ, Arruda RP, Celeghini EC, de Andrade AF, Perini AP, Resende MV, Miguel MC, Lucio AC, Hossepian de Lima VF (2012). Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia*. ;44(1):9-15.

Orgal S., Zeron Y., Elior N., Biran D., Friedman E., Druker S., Roth Z.(2011). Season-Induced Changes in Bovine Sperm Motility Following a Freeze-Thaw Procedure. *Reprod Dev.* 2011 Dec 19. [Epub ahead of print]

Orsi NM, Gopichandran N, Leese HJ, Picton HM & Harris SE. (2005). Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 129 219–228.

Bibliografía

Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Murakami M, Kikkawa Y, Suzuki T.(1997) Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology*. 34(1):36-41.

Oyamada T. y Fukui Y. (2004). Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod. Dev.* 50: 107-117

Pacey AA, Hill CJ, IW Scudamore IW, Warren MA, Barratt CLR, Cooke ID. (1995) The interaction *in vitro* of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Hum Reprod* 10, 360-366

Palasz AT. (1996). Cultivo de embriones GANADOS: recientes avances en el desarrollo de sistemas de cultivos definidos. En: IIº Simposio Internacional de Reproducción

Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES. (2005) High oxygen tension during in vitro oocyte maturation improves in vitro development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci.* 87(1-2):133-41

Parrish JJ., Susko-Parrish JL., Winer MA. and First NL. (1988) . Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38,1171–1180.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40, 1020-1025.

Parrish JJ, Krogenas A, Susko-Parrish L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995; 44:859-869

Pate BJ, White KL, Chen D, Aston KI, Sessions BR, Bunch TD, Weimer BC. (2008). A novel approach to identify bovine sperm membrane proteins that interact with receptors on the vitelline membrane of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* ;75(4):641-9.

Paula-Lopes, F.F., Chase Jr., C.C., Al-Katanani, Y.M., Krininger III, C.E., Rivera, R.M., Tekin, S., Majewski, A.C., Ocon, O.M., Olson, T.A., Hansen, P.J.(2003). Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction* 125, 285–294.

Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H.N., (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 63–67.

Payton RR., Romar R., Coy P., Saxton AM., Lawrence JL, Edwards JL. (2004). Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol Reprod.* 1303-8.

Peddinti D., Nanduri B., Kaya A., Feugang J.M., Burgess S.C., Memili E.(2008). Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst Biol.* Feb 22; 2:19.

Pelletier C., Keefe DL. & Trimarchi JR. (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and Sterility* 81 850–856.

Pérez-Crespo, M., Pintado B., Gutiérrez-Adán A. (2008). Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development.* Volume 75, Issue 1, pages 40–47.

Pérez -Garnelo S. (2005). Evaluación cualitativa seminal. XXVII Curso internacional de reproducción animal. Departamento de reproducción animal. INIA, Madrid

Pérez-Pé R., Barrios B., Muino-Blanco T., Cebrian-Perez JA. (2001a.). Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chrom B.*;760:113–121

Pérez-Pé R., Cebrián-Pérez JA., Muiño-Blanco T. (2001b). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology.* 56:425–434

Pérez-Pé R., Marti J. I., Sevilla E., Fernández-Sánchez M., Fantova E., Altarriba J., Cebrián-Pérez JA., Muiño-Blanco T. (2002). Prediction of fertility by centrifugal countercurrent distribution (CCCD) analysis: correlation between viability and heterogeneity of ram semen and field fertility. *Reproduction* 123(6): 869-75.

Petrunkina A.M., Petzoldt R., Stahlberg S., Pfeilsticker J., Beyerbach M., Bader H & Töpfer-Petersen E. (2001). Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. *Andrologia* 33; 360–367

Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Töpfer-Petersen E & Waberski D. (2005). Functional significance of sperm responsiveness to capacitating conditions. *Theriogenology.* 64 1766–1782

Petrunkina A.M., Waberski D., Günzel-Apel R. and Töpfer-Petersen E. (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species *Reproduction*, 134(1): 3 - 17

Plante G., Thérien I., and Manjunath P.(2012). Characterization of Recombinant Murine Binder of Sperm Protein Homolog 1 and Its Role in Capacitation. *Biology of Reproduction* April 25, 2012
biolreprod.111.096644

Pollard JW., Plante C., King WA., Hansen PJ., Betteridge KJ. and Suarez SS (1991) Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44,102–107.

Randolph L., Jovenal S., William K., y Henry A. (1985). The structure of caltrin, the calcium -transport inhibitor of bovine seminal plasma. *PNAS (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA Biochemistry*. Vol. 82, pp. 6490-6491, October 1985.

Rath D., Schuberth HJ., Coy P., Taylor U. (2008). Sperm interactions from insemination to fertilization. *Reprod Dom Anim*. 43 (Suppl. 5), 2–11.

Rath D., Topfer-Petersen E., Michelmann H-W., Schwartz P., Ebeling S. (2005). Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 63:352–362.

Reckova Z., Machatkova M., Rybar R., Horakova J., Hulinska P., Machal L.(2008). Evaluation of chromatin integrity of motile bovine spermatozoa capacitated in vitro. *Zygote*. Aug;16(3):195-202.

Reinert M., Calvete JJ., Sanz L., Mann K., Töpfer-Petersen E. (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem* 242; 636-640.

Relucenti M., Heyn R., Correr S. & Familiari G.(2005).Cumulus oophorus extracellular matrix in the human oocyte: a role for adhesive proteins. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* 110 219–224

Revah I, Gadella BM, Flesch FM, Colenbrander B, Suárez SS. (2000). Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties. *Biol Reprod* 62, 1010-1015.

Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., Sirard, M.A. (2002). Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 500–509.

Riffo M, Párraga M. (1997). Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: Development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. *J Exp Zool* 79:81–88.

Rizos D., Clemente M., Bermejo-Alvarez P., de La Fuente J., Lonergan P and Gutierrez-Adán A. (2008) Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 4), 44–50

Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence

of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 68: 236-243.

Rizos D., Lonergan P., Boland M.P., Arroyo-García R., Pintado B., De la Fuente J., Gutiérrez-Adán A. (2002b). Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction.* 66, 589–595.

Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M., Lonergan P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* 61:234-248.

Rodríguez C.M., Day JR., Killian G.J. (2000). Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. *J Androl.* May-Jun;21(3):414-20.

Rodríguez-Martínez H. (2000). Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non return rates of Swedish dairy AI bulls. *Reprod Dom Anim* ; 35

Roncoletta M., da Silva E., Esper C.R., (2006). Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Animal Reproduction Science.* 91, 77-87.

Roncoletta M., Morani ESC., Franceschini PH., Ramos PRR.(2000). Caracterizacão da proteína 26 kDa do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros. *Arq Fac Vet UFRGS;*28:323.

Rosenkrans, C.F.Jr., First, N.L. (1994). Effect of aminoacids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72:434-437.

Roth, Z., Arav, A., Bor, Y., Zeron, R., Braw-Tal, R., Wolfenson, D. (2001). Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reprod.* 122:737-744.

Roth Z., Hansen P. (2004). Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Of Reprod.* 71: 1898-1906.

Ruibal S., Quintela LA., Peña AI., Becerra JJ. y Herradón PG. (2006). Defining bovine oocyte in vitro maturation.*Reprod Dom Anim* 41: 108

Russell, L. D., Peterson R. N, et al., (1984). Posttesticular Surface Modifications and contributions of Reproductive Tract Fluids to the Surface Polypeptide Composition of Boar Spermatozoa." *Biol. Reprod.* 30: 959-978.

- Saacke RG (1983).** Semen quality in relation to semen preservation. *J Dairy Sci.*;66(12):2635-44.
- Saez F., Frenette G., Sullivan R. (2003).** Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *Journal of Andrology.* Vol. 24, no. 2, pp. 149–154.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E. (2006).** Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction.* 131(5):895-904.
- Sahin E., Petrunkina AM., Waberski D., Harrison RA., Töpfer-Petersen E. (2009).** Control of bull sperm cell volume during epididymal maturation. *Reprod Fertil Dev.* 21(3):469-78.
- Salvetti, N. R., Rey, F. Ortega, H. (2007).** Enfermedad quística ovárica bovina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 6 (1-2).
- Sanchez-Luengo, S., Aumuller, G., Albrecht, M., Sen, P.C., Rohm, K., Wilhelm, B.(2004).** Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. *J. Androl.* 25, 234–244.
- Sandler T. (2000).** Primera semana de desarrollo: de la ovulación a la implantación (30-47).
- Sankhala RS., Damai RS., Anbazhagan V., Kumar CS., Bulusu G., Swamy MJ. (2011a)** Biophysical investigations on the interaction of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109, with heparin. *J Phys Chem B.* Nov 10;115(44):12954-62.
- Sankhala RS., Damai RS, Swamy MJ (2011b)** Correlation of Membrane Binding and Hydrophobicity to the Chaperone-Like Activity of PDC-109, the Major Protein of Bovine Seminal Plasma. *PLoS ONE* 6(3): e17330. doi:10.1371/journal.pone.0017330

Bibliografía

Sato. E., Kawamura N. and Ishibashi. T. (1988). Chemicals influencing maturation, activation, and degeneration of bovine oocytes in culture. *J. Dairy Sci.* 71: 34-82.

Sato E., Matsuo M. and Miyamoto H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes in vitro: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate *J Anim Sci.* 68:1182-1187.

Shapiro,SS. and Wilk, MB. (1965) Testing the normality of several samples. (Unpublished manuscript)

Schoenfelder M and Einspanier R (2003). Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol. Reprod.* 69: 269-277.

Schoneck, C., Braun, J., Einspanier, R.(1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 45, 633–642.

Scolari S, Müller K, Bittman R, Herrmann A, Müller P.(2010). Interaction of mammalian seminal plasma protein PDC-109 with cholesterol: implications for a putative CRAC domain. *Biochemistry.*;49(42):9027-31.

Seaton, G. J., Hall, L., Jones, R. (2000). Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. Effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biol. Reprod.* 62, 1667-1676.

Shivaji S., Scheit K.H., Bhargava P.M., (1989). Proteins of seminal plasma. John Wiley & Sons. New York. Pp 331 – 356.

Shivaji S., Scheit K., et al., (1990). Proteins of seminal plasma. New York, John Wiley & Sons.

Siiteri JE., Ensrud KM., Moore A. & Hamilton DW. (1995). Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Molecular Reproduction and Development* 40 16–28.

Simula MP., Notarpietro A., Toffoli G., Re VD. (2012). 2-D gel electrophoresis: constructing 2D-gel proteome reference maps. *Methods Mol Biol*:815:163-73.

Singleton CL, Killian GJ. (1983). A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. *J Androl* 4:150–156.

Sinowatz F., Kölle S., E Töpfer-Petersen .(2001) . Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cell Tissue Organs* 168, 24-35.

Sirard MA. (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 28(6):483-8.

Sitaram N, Subbalakshmi C, Krishnakumari V, Nagaraj R.(1997) Identification of the region that plays an important role in determining antibacterial activity of bovine seminalplasmin. *FEBS Lett.* ;400(3):289-92.

Smith TT, Yanagimachi R. (1990). The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod.* ;42(3):450-7.

Soubeyrand, Khadir, Brindle and Manjunath (1997). *The major phospholipase A2 activity from bovine seminal plasma was recently purified [J. Biol.Chem. J. Biol.Chem. 272, 222-227*

Soubeyrand S., Lazure C., and Manjunath P.(1998) . Phospholipase A₂ from bovine seminal plasma is a platelet activating factor acetylhydrolase. *Biochem. J.* 329 (41–47)

Souza C.E., Moura A.A., Monaco E., Killian G.J.(2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1 / A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, vol. 105, pp. 72 – 8

Souza CE., Regoa J. Lobo C., Oliveirab J., Nogueirac F., Domontc G., Fioramonted M., Gozzod F., Morenoe F., Monteiro-Moreirae A., Figueiredof J., Moura A. (2012). Proteomic analysis of the reproductive tract fluids from tropically-adapted Santa Ines rams . *Journal of Proteomics*.

Spadafora C. (1998). Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays* 20, 955-964

Sprott L. R., Harris M. D., Forrest D. W., Young J., Zhang H. M, Oyarzo J. N., Bellin M. E. and R. L. Ax. (2000). Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen .*Journal of Animal Science*, Vol. 78, Issue 4, 795-798.

Srivastava N., Srivastava SK., Ghosh SK., Singh LP., Prasad JK., Kumar A., Perumal P., Jerome A., Thamizharasan A. (2012). Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2012 Mar; 131(1-2):54-62.

Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS.(1995) Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod.*;53(6):1280-5.

Starita-Geribaldi M, Poggioli S, Zucchini M, Garin J, Chevallier D, Fenichel P, Pointis G(2001) Mapping of seminal plasma proteins by two-dimensional gel electrophoresis in men with normal and impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* ;7(8):715-22

Stetson I., Izquierdo-Rico MJ., Moros C., Chevret P., Lorenzo PL., Ballesta J., Rebollar PG., Gutiérrez-Gallego R., Avilés M. (2012) Rabbit zona pellucida composition: a molecular, proteomic and phylogenetic approach. *J Proteomics*. 22;75(18):5920-35.

Stinshoff H, Krienke M, Ekhlesi-Hundrieser M, Wilkening S, Hanstedt A, Frese D, Rath D, Bollwein H, Wrenzycki C. (2012). Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. ;78(1):132-9.

Stojkovic M., Machado SA., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Hutzler P., Goncalves PB. y Wolf E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod*. 64: 904–909.

Strzezek J., Wysocki P., Kordan W., Kuklinska M., Mogielnicka M., Soliwoda D, Fraser L. (2005). Proteomics of boar seminal plasma-current (studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*;5:279–290.

Suárez SS. (1998). The oviductal sperm reservoir in mammals: Mechanisms of formation. *Biol Reprod* 58, 1105-1107.

Suárez SS. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 37,140-143.

Suarez SS. (2008) Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update*.14(6):647-57.

Suarez SS., Pacey A.A. (2006) Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*; 12: 23-37

Suárez SS., Redfern K, Raynor P, Martin F, Phillips DM. (1991). Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct *in vitro*, possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 44, 998-1004.

Sullivan R. (2004). Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci.*; 82-83:341-7

Sullivan R., Saez F., Girouard J., Frenette G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.* Jul-Aug; 35(1):1-10.

Summers MC., McGinnis LK., Lawitts JA., Biggers JD. (2005) Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Human Reproduction* 20 1364–1371

Sun Y, Li B, Fan LQ, Zhu WB, Chen XJ, Feng JH, Yang CL, Zhang YH. (2012). Does sperm morphology affect the outcome of intrauterine insemination in patients with normal sperm concentration and motility? *Andrologia.* Feb 16. doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01280.x.

Sun QY, Nagai T. (2003). Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation y fertilization. *J Reprod Dev.*;495:347-359.

Sun QY. (2003a) Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique* 61 342–348

Süss, U., Madison, V. (1983). Morphology and meiotic development of bovine oocytes cultured *in vitro*. *Arch. Androl.* Vol. 11, pp. 217-21

Suzuki K., Asano A, Eriksson B, Niwa K, Nagai T, Rodríguez-Martínez H. (2002). Capacitation status and *in vitro* fertility of boar spermatozoa: Effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan. *Int J Androl* 25, 84-93.

Talevi R., Gualtieri R., (2010) .Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 73, 796–801.

Tannert A., Kurz A., Erlemann K., Müller K., Herrmann A., Schiller J., Töpfer-Petersen E., Manjunath P. and Peter Müller. (2007). The bovine seminal plasma protein PDC-109 extracts phosphorylcholine-containing lipids from the outer membrane leaflet .*European biophysics journal* : 36(4-5):461-75.

Taylor RS., Wu CC., Hays LG., Eng JK., Yates JR. 3rd and Howell KE.(2000) Proteomics of rat liver Golgi complex:minor proteins are identified through sequential fractionation, electrophoresis 21, 3441-3459.

Tedeschi G., Oungre E., Mortarino M., Negri A., Maffeo G. and Ronchi S. (2000). Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur. J. Biochem.* 267, 6175-6179

Tervit H.R.; Whittingham D.G. and Rowson L.E.A. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.* 30: 493-497.

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 Reprod Dev.* 71:97–106.

Thérien, I., Bousquet D., and Manjunath P. (2001) Effect of Seminal Phospholipid-Binding Proteins and Follicular Fluid on Bovine Sperm Capacitation: *Biology of Reproduction* 65, 41-51

Thérien I., Moreau R., Manjunath P. (1998). Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59:768-776.

Thérien I, Moreau R, Manjunath P. (1999). Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* ;61(3):590-8.

Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. (1997). Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57:1080-1088.

Thibault C., Szollosi U. y Gerard M., (1987). Mammalian oocyte maturation.

Reprod. Nutr. Develop. 27: 865-896

Thompson J.G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos. A decade of achievement. *Animal Reproduction Science* 60–61. 263–275.

Thompson JG., DK Gardner, PA Pugh, WH McMillan, ER Tervit. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53,1385-1391.

Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh, P.A., Tervit H.R., (1992a). Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 253–257.

Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoлова M, Leeb T, Kirchhoff C, Müller P.(2005). Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia.* 37(6):202-4.

Toshimori K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microsc Res Tech.* May 1; 61(1):1-6.

Tulsian D.R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol.* May 16;250(1-2):58-65.

Tulsian D.R., Zeng H.T., A. (2007). Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. Soc reprod fertil suppl.; 63:257-72.

Turri F, Madeddu M, Gliozzi TM, Gandini G, Pizzi F(2012) Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality. Reprod Domest Anim.47(5):712-7.

UNEP-FAO. (2000) (Roma, Italia) 28 p 7 -18.

Urner F, Sakkas D. (2003) Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa.

Reproduction. 125(1):17-26

Valcarcel A., De las Heras M. A., Pérez L., Moses D.F., Baldassarre H. (1994). Fluorescent Staining as a Method of Assessing Membrane Damage and Post-Thaw Survival of Ram Spermatozoa. Theriogenology. 41(2): 483-489.

Van Winkle LJ. (2001). Amino acid transport regulation and early embryo development. Bio Reprod 64, 1-1.

Velásquez JG. (1998a). Características fisiológicas de la raza San Martinero. Memorias seminario internacional Caracterización Genética y potencial productivo del ganado criollo San Martinero. ICA UNILLANOS; CORPOICA; PRONATTA pág. 8.

Velásquez, J. G. (1999). Características fisiológicas de la raza San Martinero. En: Memorias. Seminario Internacional Caracterización genética y potencial productivo del ganado San Martinero. Villavicencio, 28 de mayo de 1999. P 8-19

Bibliografía

Velásquez, J.G.; Flórez, D.H. Cardozo, J. (1996). Respuesta fisiológica al estrés por calor en vacas criollo San Martinero. Memorias del tercer congreso iberoamericano de razas autóctonas y criollas. Santafé de Bogotá, Colombia.

Velásquez JG, Flórez H, Cardozo JA, Castro A, Parra A, Velásquez JH, Onofre HG, Jiménez H, Villar C, Góngora O. (1998). Tolerancia al calor de bovinos criollo San Martinero, Cebú, Holstein y San Martinero x Cebú en Colombia. Memorias IV congreso Iberoamericano de Razas autóctonas y criollas. Tampico, Universidad Autónoma de Tamaulipas, México nov. 23

Velásquez JG, Cardozo J, Velásquez JH, Onofre G. (1998b). Efecto de la radiación directa y sombra en el estatus ácido básico, T3, T4 y la calidad espermática del ganado Cebú en condiciones del Piedemonte Llanero. Revista Colombiana de ciencias pecuarias Vol. 12, pág. 183.

Velásquez J.G., Cardozo J, Arce J, Cusme W. (1999a). Caracterización del moco cervical y su relación con la fertilidad en hembras doble propósito en condiciones del Piedemonte Meta." Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias ISSN: 00000000 Ed: v.12 fasc.176 p.176 - ,1999

Velásquez JG, Góngora a, Lesmes N, Mendoza D. (2000). Evaluación etológica y productiva del ganado criollo San Martinero al destete en la Orinoquía Colombiana. Memorias Agrociencia Tecnología Siglo XXI. CORPOICA Reg. 8. Pg. 35

Velásquez J.G., Góngora A., Vanegas O., Parra J.L., Flórez h., Cardozo J.(2000a) Perfiles endocrinos, hemoglobina y hematocrito durante el posparto de vacas criollas San Martinero Pág. 109. Revista Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana de la Universidad de los Llanos ISSN 0121-370. 2000.

Velásquez, J.G., Marcos, J., Barajas, P., Gardón, J.C., Jiménez-Movilla, M., Ballesta, J., Coy P., Avilés, M. (2004) Involvement of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida interaction. Hum Reprod 19 (Supp 1): 155.

Bibliografía

Velásquez J.G., Ariztizabal J., Caicedo R., Lesmes N., Mendoza D., Velásquez J.H., González G. (2005). Comportamiento social y productivo del ganado criollo San Martinero en la Orinoquia Colombiana. Plegable Cód. 02.08.41.08.33.04.

Velásquez, J.G., Barajas, P., Marcos, J., Ballesta, J., Avilés, M., Coy P. (2005). Evidences for the presence of sialidase enzyme in the bovine oocyte. Its role in the block to polyspermy. *Reprod Dom Anim*

Velásquez G., Cánovas S., Barajas P., Marcos J., Jiménez- Movilla M., Gutiérrez R., Ballesta J., Avilés M., Coy P. (2007). Role of sialic acid in bovine sperm–zona pellucida binding. *Molecular Reproduction and Development*. 74:617–628

Velazquez M.L., Alfaro N., Dupuya C., Salvetti N., Reya F., Ortega H. (2010). Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science* 118: 201–209.

Virji N, Phillips DM, Dunbar BS. (1990) Identification of extracellular proteins in the rat cumulus oophorus. *Mol Reprod Dev*. 25(4):339-44

Visconti PE., Kopf GS. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 59:1–6.

Visconti, P. E., Westbrook, V. A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S.

and Diekman, A. B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm

acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* 53, 133-150.

Bibliografía

Waberski D., Döhring A., Ardón F., Ritter N., Zerbe H., Schuberth H.J., Hewicker-Trautwein M., Weitze K.F., Hunter RH. (2006). Physiological routes from intra-uterine seminal contents to advancement of ovulation. *Acta Vet Scand.* 3;48:13.

Wai P.Y., Kuo Paul. (2004). The role of Osteopontin in tumor metastasis. *Journal of Surgical Research* (Vol. 121, Issue 2, Pages 228-241

Wang D., King SM., Quill TA., Doolittle LK., Garbers DL.(2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat Cell Biol.* (12):1117-22.

Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P Boland M.P. (2000) Factors affecting recovery and quality of oocyte for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technologic. *Theriogenology* 54:33-46

Wassarman PM. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57:415- 442

Wassarman PM, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H y Williams Z. (1999) Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 285:251-258

Watson PF. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's . Physiology of Reproduction.* L. G.E. New York, Churchill Livingstone.

Watson PF. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* . 60-61:481-49

Wilkins, M.R. (1996). Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, v.17, p.830-888

Williams G.L., Amstalden M., Garcia MR., Stanko RL., Nizielski SE. (2002). Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 23:339-349

Williams C. (2002). Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Hum Reprod*; 8(4):313-321.

Wise ME., Armstrong DV., Huber JT., Hunter R., Wiersma F. (1988) Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J Dairy Sci.* ;71(9):2480-5.

Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath JW. and Niemann H. (1996) Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* 108 17-2

Wessel, G.M., Brooks, J.M., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zayfudim, V., & Conner, S. (2001) The Biology of Cortical Granules. *International Review of Cytology*

Whitfield C.H., Parkinson T.J. (1992). Relationship between fertility of bovine semen and in vitro induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology.* 38:11-20.

Winnica DE., Novella ML., Dematteis A., Coronel CE. (2000). Trypsin/acrosin inhibitor activity of rat and guinea pig caltrin proteins. Structural and functional studies. *Biol Reprod*; 63. 42-8

Wright PC., Noirel J., Ow SY., Fazeli A. (2012). A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. *Theriogenology.* 1;77(4):738-765.e52.

Witting I and Schagger H (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*. 8(19):3974-90.

Yanagida M. (2002). Functional proteomics; current achievements *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. May 5;771(1-2):89-106. Review.

PMID: 12015994 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Yanagimachi R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. En: *Fertilization and embryonic development in vitro*. Ed.: Mastroianni, L., Biggers, J.D. Plenum Press, New York. pp 81-182

Yanagimachi R. (1988). Mammalian fertilization In: Knobil E, Neill JD (Eds) *The Physiology of Reproduction*, New York, NY 135-185

Yanagimachi R. (1994). Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. pp 189–317).

Yeagle P.E. (1985). Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*. 822: 267-87

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

Yonezawa N., Norio Fukui N., Kuno M., Shinoda M., Goko S., Mitsui S. and Nakano M. (2001). Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur. J. Biochem*. 268, 3587±3594

Yonezawa N., Kudo K., Terauchi H., Kanai S., Yoda N., Tanokura M., Ito K., Miura K-I., Katsumata T., Nakano M. (2005) . Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J Biol Chem* 280:20189–20196

Yonezawa N, Amari S, Takahashi K, Ikeda K, Imai FL, Kanai S, Kikuchi K, Nakano M. (2005a). Participation of the nonreducing terminal beta-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev.* 70(2):222-7.

Yoon T.K., Chung H.M.; Lim J.M.(2000).Pregnancy and delivery of healthy infants development from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and sterility*, 74: 180-181

Young LE, Sinclair KD, Wilmut I.(1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod.* ;3(3):155-6

Yuan, Y.Y., Chen,W.C., Shi, Q.X., Mao, L.M., Yu, Q., Fang, X., Roldan, E.R.S., (2003). Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.* 68, 904–913.

Zhang Y, Zhu Y, He F. (2011). An overview of human protein databases and their application to functional proteomics in health and disease. *Sci China Life Sci.* 2011 Nov;54(11):988-98.

Zhou GB., Liu GS., Meng QG., Liu Y., Hou YP., Wang XX., Li N., Zhu SE. (2009).Tetraspanin CD9 in bovine oocytes and its role in fertilization. *J Reprod Dev.*55(3):305-8

Zhu J., Xu X., Cosgrove JR., Foxcroft GR. (2000). Effects of semen plasma from different fractions of individual ejaculates on IVF in pigs. *Theriogenology.* 54: 1443-1452

Zhu G, Millar B, Boucheix C, Rubinstein E, Liu C, Hynes R, Myles D, Primakoff P (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development*; 129(8):1995-2002

Zini A., Gagnon C., Lamirande, E. (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. Volume 16, Issue 3, pag. 183–188.