Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2009) 10(1), 51-59

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad

Effect of seminal plasma proteins at freezing on ram sperm motility and viability

Jaime Antonio Cardozo[1], Patricia Grasa[2], María Teresa Muiño B.[3], José Álvaro Cebrián P.[4]

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the cryoprotective effect of seminal plasma proteins on ram sperm motility, membrane integrity and the changes in the profile of ram sperm membrane proteins induced by cryopreservation. Fresh ejaculates from 8 mature Rasa aragonesa rams were used. Sperm motility and cell viability was assessed. The freezing procedure was based on the method described by Fiser *et al*. (1987). Proteins extracted from fresh and frozen-thawed semen were subjected to the Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. A significant improvement in the quality of frozen-thawed sperm was obtained after addition of seminal plasma proteins ($p < 0.05$). Comparative two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis analysis between fresh and frozen semen, either with or without seminal plasma proteins in the cryopreservation medium, revealed that eight protein spots were lost in frozen-thawed sperm. The concentration of one sperm membrane protein spot of low Mr (spot 2) was higher ($p < 0.05$) in protein-added frozen sperm. Correlations found between certain protein spots sperm motility and viability suggests that these proteins could play important roles in the maintenance of sperm integrity and functionality. In conclusion, the addition of seminal plasma proteins to freezing extender improved frozen-thawed ram sperm integrity quality and cryopreservation of ram semen produced variations in the sperm membrane protein composition.

Keywords: 2D PAGE, ram sperm, seminal plasma, freezing, sperm membrane proteins.

RESUMEN

Este estudio se adelantó para evaluar el efecto de la adición de proteínas del plasma seminal de cordero en la criopreservación sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática, y los cambios en el perfil electroforético de las proteínas de la membrana espermática inducidos por la criopreservación. Se usaron eyaculados de ocho corderos adultos de la raza rasa aragonesa, se les determinó su viabilidad y motilidad espermáticas y posteriormente se sometieron a un procedimiento de congelación. Las proteínas se separaron por el método de electroforesis en geles de acrilamida en dos dimensiones. Se obtuvo un mejoramiento significativo ($p < 0,05$) en la calidad del semen congelado, cuando se adicionaron proteínas del plasma seminal. El análisis bidimensional comparativo entre el semen fresco y el congelado evidenció la pérdida de 8 puntos de proteína en el espermatozoide descongelado. La concentración de un punto de proteína de membrana espermática, de bajo peso molecular (punto 2), fue más alta ($p < 0,05$) en el espermatozoide descongelado al que se adicionaron proteínas del plasma seminal. Se encontraron correlaciones entre algunos puntos de proteína y la motilidad y viabilidad espermáticas, lo cual sugiere que pueden jugar papeles importantes en el mantenimiento de la integridad y funcionalidad del espermatozoide. Se puede concluir que la adición de proteínas del plasma seminal en la congelación mejora la integridad del espermatozoide descongelado, y que la criopreservación del semen de cordero produce variaciones en la composición de las proteínas de membrana.

Palabras clave: 2D PAGE, espermatozoide ovino, criopreservación, proteínas de la membrana espermática.

INTRODUCCIÓN

La fertilidad del semen ovino congelado es baja, cuando se usa en inseminación artificial (Salamon y Maxwell 2000; Yoshida, 2000). Se sabe ampliamente que el espermatozoide ovino es más sensible al estrés térmico por frío que el de otras especies como el bovino, el conejo o el hombre (Fiser y Fairfull, 1989; Watson, 2000). El proceso de criopreservación y descongelación induce severos cambios al espermatozoide mamífero (Medeiros *et al*., 2002) debidos

Radicado: 14 de noviembre de 2008
Aprobado: 3 de febrero de 2009

[1] Investigador Ph.D. Asistente, Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), Corpoica. jcardozo@corpoica.org.co
[2] Investigador Ph.D. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. patgrasa@unizar.es
[3] Profesor Investigador Ph.D. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. muino@unizar.es
[4] Profesor Investigador Ph.D. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. pcebrian@unizar.es

© 2009 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

a estrés térmico, mecánico, químico y osmótico (Holt *et al*., 1992; Holt y North, 1994; Watson, 1995), entre los que se encuentan cambios morfológicos en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la membrana del espermatozoide (Hammerstedt *et al*., 1990; Thomas *et al*., 1998; Bailey *et al*., 2000; Januskauskas *et al*., 2003; Guillaume *et al*., 2004) y la correspondiente reducción en la fertilidad del eyaculado (Ricker *et al*., 2006).

La pérdida de viabilidad y motilidad espermáticas no explican totalmente la reducción de la fertilidad del semen congelado y se ha sugerido que puede deberse parcialmente a la pérdida de proteínas de la membrana del espermatozoide necesarias para la fertilización (Lessard *et al*., 2000). La membrana plasmática del espermatozoide sirve de barrera estructural y de interfase de comunicación con el medio ambiente extracelular (Harvey *et al*., 2001), y transmite señales bioquímicas originadas de interacciones entre el ligando y el receptor, del medio exterior al interior de la célula (Olden *et al*., 1985). Por lo tanto, la membrana plasmática del espermatozoide es un elemento fundamental para el éxito de la fecundación.

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE, por sus iniciales en inglés) se ha usado para la separación y análisis de proteínas del plasma seminal (PPS) de toro (Desnoyers *et al*., 1994; Mortarino *et al*., 1998; Jobim *et al*., 2004), caballo (Brandon *et al*., 1999), carnero (Souza *et al*., 2004; Jobim *et al*., 2005; Cardozo *et al*., 2006), cerdo (Sanz *et al*., 1993) y hombre (Bohring *et al*., 2001; Pixton *et al*., 2004); y también para la separación y análisis de las proteínas de la membrana del espermatozoide humano (Naaby-Hansen *et al*., 1997) y del cerdo (Haden *et al*., 2000). Sin embargo, el perfil de proteínas por 2D-PAGE de la membrana del espermatozoide del carnero sometida a congelación/descongelación no ha sido aún estudiado. Este estudio se realizó para evaluar el efecto crioprotector de las proteínas del plasma seminal en la motilidad e integridad de la membrana del espermatozoide del carnero, y en los cambios en el perfil 2D-PAGE, de las proteínas de la membrana del espermatozoide inducidos por la congelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del semen y preparación del espermatozoide

Los experimentos se realizaron con semen fresco proveniente de 8 carneros (raza rasa aragonesa) de 2 a 4 años de edad, obtenido con vagina artificial. Los animales utilizados pertenecen a un genotipo español, cuyas hembras presentan un corto anestro estacional entre los meses de mayo y agosto. Los animales pertenecían a la Asociación Nacional de Criadores de la Raza Rasa Aragonesa (ANGRA) y estuvieron alojados en el servicio de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza en condiciones nutricionales uniformes.

Teniendo en cuenta los resultados positivos sobre la viabilidad de los espermatozoides del carnero en relación con el periodo de abstinencia y las sucesivas eyaculaciones, encontradas por Ollero y colaboradores (1996), los machos se sometieron a un período de abstinencia de dos días entre ensayos y solamente se utilizaron los segundos eyaculados en cada ensayo. Para evitar las diferencias individuales, se utilizó la mezcla de los segundos eyaculados de los animales (Ollero *et al*., 1996), mientras que para determinar las diferencias en la congelación de las muestras de semen de los carneros, se utilizaron los eyaculados por separado.

Evaluación del semen

La concentración espermática se calculó en duplicado en cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-königshofen). La motilidad espermática se evaluó subjetivamente por estimación visual con un sistema de microscopia (aumento 100x), unido a un equipo de televisión (Evans y Maxwell, 1987). El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se estimó a incrementos de 5%, y fue realizado por la misma persona durante todo el estudio. La viabilidad celular (integridad de la membrana) se evalúo de acuerdo con el método de Harrison y Vickers (1990), para lo cual se utilizó una tinción fluorescente compuesta por diacetato de carboxifluoresceina y yoduro de propidio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); el análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia marca Nikon. Se contaron hasta un total de 100 espermatozoides, teniendo en cuenta que aquellos positivos a la fluoresceína se tiñen de color verde y tienen su membrana intacta; y aquellos positivos a yoduro de propidio se tiñen de color rojo y tienen su membrana dañada. Estos análisis se realizaron tanto con semen fresco como con semen congelado.

Obtención de las proteínas del plasma seminal

El plasma seminal se obtuvo por centrifugación de un ml de semen a 7500 x *G* durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se separó y se centrifugó nuevamente, en iguales condiciones a la primera centrifugación, y este nuevo sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,22 µm y se colocó a -20°C hasta su análisis.

Las proteínas del plasma seminal se obtuvieron por filtración del plasma a través de microconcentradores "Microsep" con corte a un peso molecular de 3 kDa (Filtron Tech. MA, Estados Unidos). La centrifugación se realizó por un tiempo mínimo de 6 h, a 3000 x *G*, y a 4°C. La

muestra de proteínas concentrada obtenida se diluyó con 5 volúmenes de un medio que contenía 0,25 M sucrosa, 0,1 mM EGTA, 4 mM fosfato sódico pH 7,5, 10% (v/v) de un tampón de Hepes (50 mM glucosa, 100 mM Hepes, 20 mM KOH) diluido 10 veces y se centrifugó nuevamente. Las proteínas se recuperaron y se guardaron a -20°C. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Procedimiento de congelación

El procedimiento de congelación se basó en el método descrito por Fiser y colaboradores (Fiser *et al*., 1987). El semen se diluyó a una concentración final de 4 x 10^8 cells/ml en la fracción I del diluyente, llamada FI, (Tris, D (+) fructosa, ácido cítrico anhidro, penicilina G, dihidroestreptomicina, agua destilada) pH 7,5, del medio de Fiser. Las proteínas del plasma seminal se adicionaron directamente al FI, en una concentración de 25 mg/ml. A las muestras control no se les agregó aditivo alguno.

Posterior a la dilución, las muestras se colocaron en un baño con control de temperatura programable (PolyScience-Minitub), permitiendo que la temperatura descendiera de 36ºC a 5ºC, a una tasa promedio de enfriamiento de 0,4 ºC/min. Tan pronto se alcanzó la temperatura de 5ºC, se agregó la fracción II (citrato trisódico x $2H_2O$, TES, glicina, lactosa mono hidrato, rafinosa 5x H_2O, D (+) fructosa, dextrano B, agua destilada) del medio de Fiser. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura por un tiempo de 2 horas (fase de equilibrio) antes de proceder a su congelación. Posteriormente, las muestras se empacaron en pajillas plásticas de 0,25-ml, las cuales se colocaron en un soporte hecho de teflón y se introdujeron en un biocongelador programable controlado por computador (Microdigitcool 250-IMV Technologies®, France) para su congelación. La técnica de congelación utilizada empleó tres pasos como sigue: de 5°C a -12°C, a una tasa de 5°C min^{-1}; de -12°C to -40°C, a una tasa de 20°C min^{-1}, y finalmente, de -40°C to -120C, a una tasa de 30°C min^{-1}. Una vez que se completó el protocolo de congelación, las pajillas se retiraron del congelador y se guardaron directamente en nitrógeno líquido a -196°C. En todos los casos la concentración final de las pajillas fue de 100 millones de espermatozoides/pajilla.

El proceso de descongelación de las pajillas se efectuó en un baño de María a 60°C durante 4 segundos.

Extracción y precipitación de las proteínas de membrana del espermatozoide

Las muestras de semen fresco y descongelado (5 x 10^8 espermatozoides) se resuspendieron en 2,5 ml de solución fosfatada buferada (PBS); posteriormente se centrifugaron (7.500 x *G*, durante 5 min) a temperatura de salón y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido en ambos casos se resuspendió nuevamente en 2,5 ml de PBS y se centrifugó (7.500 x *G*, 5 min) a temperatura de salón. Este procedimiento se realizó dos veces. Finalmente, el precipitado obtenido se disolvió en 100 µl de un medio de extracción de proteínas que contenía 2% dodecil sulfato sódico (SDS), 28% sucrosa, 12,4 mM tetra metil etilen diamina (TEMED) y 185 mM Tris–HCl, pH 6,8 - 7 (Roldan y Harrison, 1988), y se incubó durante 5 min a 100°C. La suspensión final se centrifugó nuevamente a 7.500 x g, durante 5 min y se recuperó el sobrenadante.

Las proteínas (de las muestras de membrana espermática y del medio de congelación) se precipitaron por el método del acido tricloroacético/acetona (TCA)/ acetona *(Görg et al*., 2004). La precipitación se efectuó de la siguiente forma: el sobrenadante se resuspendió en 9 volúmenes de una solución compuesta por 10% TCA, 0,12% DTT en acetona, preenfriada a -20°C. La precipitación se realizó durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 12.000 x *G*, durante 30 min a 4°C. El precipitado se lavó con una solución de acetona preenfriada (-20°C) que contenía 0,12% ditio treitol (DTT) y se centrifugó a 12.000 x g, 30 min; el sobrenadante se descartó y el precipitado se secó al vacío, resuspendiéndose posteriormente en un tampón de muestra, al que se adicionó 10% de un coctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), y la muestra se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)

La muestra de proteínas de membrana se preparó para la electroforesis de la siguiente forma: 82 µg de la muestra de proteínas se diluyeron en 125 µl de un tampón de muestra compuesto por: 5 M urea, 2 M tiourea, 2% [Propano sulfonato de 3-(3-(colamidopropil) dimetil-amonio)-1] (CHAPS), 2 mM Tributil fosfina (TBP), 2% sulfobetaina (SB-310), 40 mM hidroximetil amonio (TRIS), anfolitos Bio-Lyte™ 3/10, 0,2% (Bio-Rad, Hercules), azul de bromofenol 0,0002%, y 5 µl de estándar 2D-PAGE (Pierce, Perbio Science, Reino Unido).

Las muestras se sometieron a la 2D-PAGE tal como fuera descrito por O'Farrell (1975). El isoelectroenfoque (IEF), o primera dimensión, de las proteínas se realizó utilizándose tiras de 7 cm, en gradiente de pH inmovilizado

de 4-7 (IPG; pH 4-7; Bio Rad, Hercules). Las tiras se colocaron toda la noche en el canal de una bandeja de rehidratación que contenía la solución descrita anteriormente. El isoelectroenfoque se realizó en el Protean® IEF Cell (Bio-Rad, Hercules) a 18,000 V y 20ºC. Posteriormente, la tiras se equilibraron durante 15 minutos en 2,5 ml de un tampón de equilibrio (I) cuya composición era 6 M urea, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glicerol, y 2% (p/v) DTT. A continuación se descartó este primer tampón de equilibrio y se reemplazó por 2,5 ml de un segundo tampón (II), que contenía 6 M urea, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glicerol, y 2,5% (p/v) Iodoacetamida. Finalmente, la segunda dimensión se realizó sobre un gel de poliacrilamida en gradiente de concentración lineal 9%-20% (SDS-PAGE), empleándose un Miniprotean II (Bio-Rad, Hercules).

Después de finalizada la segunda dimensión, los geles se tiñeron con Sypro-Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes) y se escanearon en un documentador de geles "gel doc System" equipado con un software para análisis molecular (Bio Rad, Hercules). Las imágenes de los geles en dos dimensiones se analizaron con el programa PD-Quest™ 2-D (Bio-Rad, Hercules), para determinar el contenido relativo de los puntos de proteína. Se asignó un sistema de numeración correlativo en función del peso molecular de los puntos de proteína, a cada punto de proteína. Los datos se usaron para estimar la cantidad relativa de cada punto de proteína y para crear un mapa de las proteínas presentes en cada muestra.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron durante la estación de apareamiento. La investigación se diseñó para establecer los cambios en el perfil 2D-PAGE de las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide por efecto de la adición de proteínas del plasma seminal en el protocolo de congelación, e igualmente establecer el efecto sobre los valores de motilidad y viabilidad espermática del semen posterior a la descongelación. En cada uno de los experimentos 2D-PAGE, se utilizaron aproximadamente 3 x 10^8 células tanto de semen fresco como de semen congelado. En cada experimento se analizaron los mapas electroforéticos de las proteínas de membrana del espermatozoide proveniente de semen fresco (control), de semen congelado al que no se le adicionó proteínas de plasma seminal y de semen congelado al que se le adicionó proteínas del plasma seminal. El experimento se replicó tres veces y se realizaron tres electroforesis por cada experimento. Los datos de concentración de las proteínas y de motilidad y viabilidad espermáticas obtenidos se transformaron por logaritmo y se analizaron bajo un modelo completamente al azar:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon E_{ij}$$

Donde:
Y_{ij} = concentración relativa de cada proteína
μ = media total
$\alpha_{i:}$ = efecto de la adición de las proteínas de plasma seminal
εE_{ij} = error experimental

Se realizó un análisis de varianza y una prueba Tukey para comparación de medias. Los valores de probabilidad menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Así mismo, se analizó la correlación entre los parámetros de calidad espermática y la concentración de las proteínas de membrana por el método del coeficiente de Pearson.

Los análisis estadísticos se realizaron por el procedimiento del modelo lineal general del sistema SAS® (SAS system, 1999). Los resultados se muestran como el promedio (± SEM) de 3 muestras replicadas.

RESULTADOS

Efectos de la adición de proteínas del plasma seminal al momento de la congelación en los valores de motilidad y viabilidad del semen eyaculado

Los resultados obtenidos evidenciaron un incremento significativo ($p < 0,05$) en los porcentajes de motilidad espermática por efecto de la adición de las proteínas del plasma seminal (22% ± 1,22% para el control *vs*. 40% ± 2,74% para el tratamiento con proteínas del plasma seminal). Así mismo, se evidenció un significativo incremento en los valores de viabilidad espermática ($p < 0,05$) de los eyaculados tratados con proteínas del plasma seminal al momento de la congelación (20,9% ± 2,11% para el control y 38,8% ± 3,69% para el grupo tratamiento).

Efectos de la adición de PPS durante la congelación en los perfiles electroforéticos de las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide del carnero

En la figura 1 se muestran los mapas referenciales 2D PAGE de las proteínas obtenidas de la membrana plasmática del espermatozoide fresco, congelado sin PPS y congelado con PPS (figuras 1A, 1B y 1C). Así mismo, se muestra el mapa referencial de las proteínas procedentes del medio de congelación (yema de huevo). Mapas 2D-PAGE similares se obtuvieron para cada tipo de muestra, con una gran reproducibilidad (90%) y baja variabilidad (5%) en la presencia de puntos de proteína.

El análisis de las imágenes permitió detectar 196 puntos de proteína en la membrana de espermatozoi-

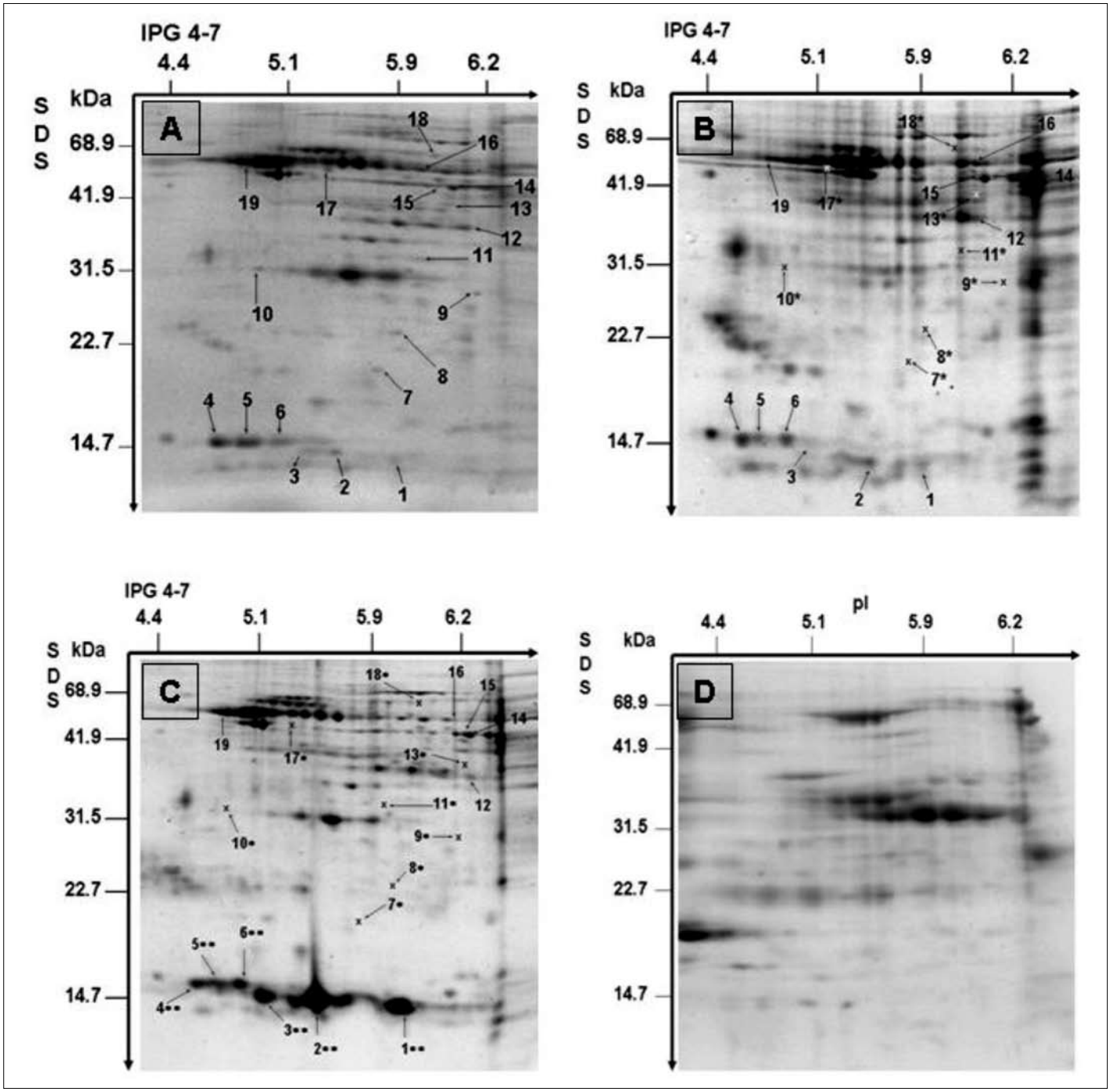

Figura 1. Mapas electroforéticos bidimensionales de las proteínas de membrana plasmática del espermatozoide provenientes de: (A) semen fresco; (B) semen descongelado sin PPS; (C) semen descongelado con PPS; (D) proteínas provenientes del medio de congelación. Los valores aproximados de los marcadores de peso molecular se relacionan a la izquierda y los de punto isoeléctrico, en la parte superior de las imágenes
* Puntos de proteína perdidos durante la congelación.
** Puntos de proteína provenientes del plasma seminal.

des provenientes de semen fresco (figura 1A), 209 en espermatozoides procedentes de semen congelado sin PPS (figura 1B) y 207 en espermatozoides de semen congelado con PPS (figura 1C). Las proteínas encontradas presentaron puntos isoeléctricos (pI) entre 4,4 y 6,3, y pesos moleculares (M_r) entre 14,1 y 70,6 kilodalton (kDa).

El análisis de las imágenes permitió así mismo identificar 82 puntos de proteína, encontrados exclusivamente en muestras de semen congelado; 32 de los cuales se encontraron solamente en las muestras congeladas a las que no se les agregó PPS, mientras que otros 18 puntos sólo se encontraron en muestras congeladas a las que se les agregó PPS (datos no presentados).

Como se enunció anteriormente, se realizó una prueba de correlación entre los parámetros de motilidad y viabilidad espermática, y los valores de concentración de los puntos de proteína de membrana del espermatozoide procedente de semen fresco. Dicha prueba evidenció la existencia de correlación entre cinco de estos puntos y la motilidad espermática ($p < 0,01$), y entre el punto 16 y la viabilidad ($p < 0,01$). Se observó igualmente que ocho puntos de proteína de la membrana se pierden durante el proceso de congelación (tabla 1).

Tabla 1. Coeficientes de correlación (r; $p < 0,01$) entre los puntos de proteína de la membrana del espermatozoide de semen fresco de carnero y los parámetros de calidad espermática.

Número estándar asignado al punto de proteína	M_r (kDa)	Punto isoeléctrico	Motilidad espermática (r)	viabilidad espermática (r)
1	14,8	6,1		
2	14,9	5,8		
3	15,1	5,1		
4	15,6	4,6		
5	15,7	4,8		
6	15,7	5,0		
7*	21,1	5,8		
8*	25,2	5,9		
9*	29,2	6,2		
10*	33,9	4,9		
11*	34,0	5,9		
12	39,1	6,2	0,95	
13*	42,3	6,1		
14	46,94	6,17	0,95	
15	47,05	6,14	0,91	
16	50,80	6,11	0,88	0,95
17*	51,1	5,7		
18*	56,8	6,1		
19	57,32	4,86	0,96	

* Puntos de proteína perdidos durante el proceso de congelación.

Finalmente, el análisis de las imágenes de los mapas electroforéticos evidenció que el contenido del punto de proteína identificado con el número dos (tabla 1, figura 1C) fue mayor en el esperma proveniente de semen congelado al cual se le adicionó PPS ($p < 0,05$). Tanto el peso molecular como el punto isoeléctrico de este punto coinciden con el de un punto de proteína procedente del plasma seminal (dato no mostrado).

DISCUSIÓN

El presente estudio evidenció un significativo mejoramiento de la calidad espermática del semen congelado cuando se adicionan proteínas del plasma seminal ovino. Los resultados benéficos de la adición de las proteínas del plasma seminal en el mejoramiento de la motilidad y viabilidad espermática posdescongelación ya se han reportado anteriormente (Ollero *et al*., 1997a, 1997b, 1998b).

En cuanto a los estudios electroforéticos 2D-PAGE, se evidenció en los análisis comparativos la existencia de diferencias cuantitativas en el número de puntos de proteína de membrana detectados en cada tipo de muestra (semen fresco, congelado sin proteínas del plasma seminal y congelado con proteínas del plasma seminal). La pérdida de ocho puntos de proteína en el espermatozoide congelado detectada en el análisis indica que estos polipéptidos deben haberse perdido como resultado del daño inducido por el proceso de congelación-descongelación. Resultados similares fueron reportados en semen congelado de toro, analizado por SDS-PAGE (Ollero *et al*., 1998a).

La alta cantidad de proteínas extraídas de las muestras congeladas podría deberse a que la incubación con el detergente de extracción empleado hubiera removido otras proteínas. Este incremento en el número de proteínas extraídas puede ser interpretado como el resultado del daño ocasionado a la membrana por la congelación, lo cual provocaría una mayor sensibilidad de la membrana del espermatozoide a la acción del detergente, como fue reportado anteriormente (Ollero *et al*., 1998a). En este sentido, se ha reportado la desestabilización (Steponkus y Lynch, 1989) y la permeabilización de la membrana plasmática, con pérdida de proteínas integrales de membrana y componentes intracelulares vitales para el funcionamiento del espermatozoide (Watson *et al*., 1992), en respuesta al proceso de congelación-descongelación.

Los resultados evidencian un alto contenido del punto de proteína identificado con el número dos, en espermatozoides provenientes de semen congelado al cual se le adicionaron proteínas del plasma seminal. Tanto su peso molecular como su punto isoeléctrico evidencian su correspondencia con un punto de proteína procedente del plasma seminal con idénticos valores; de lo cual se puede inferir que la alta concentración de este punto de proteína se debe a la adsorción de esta proteína a la superficie del espermatozoide. Observaciones de otros investigadores han evidenciado que las proteínas del plasma seminal se adsorben a la superficie de la célula espermática, modificando las características funcionales del espermatozoide deteriorado y reproduciendo aquéllas de la célula viva (García-López, 1996; Ollero *et al*., 1997; Barrios *et al*., 2000).

Es posible que aquellos puntos de proteína que sólo se encontraron en las muestras de semen congelado y en cuyo medio de congelación no se adicionaron PPS correspondan a proteínas provenientes de la yema de huevo

usada en el medio de congelación. De otra parte, no todos los puntos de proteína encontrados en las muestras congeladas coincidían con puntos del medio de congelación, razón por la cual se podría sugerir que algunos de estos puntos de proteína pueden ser proteínas integrales de membrana que fueron extraídas como consecuencia del daño ocasionado a la membrana por la congelación.

Las correlaciones encontradas entre ciertos puntos de proteína y la motilidad y viabilidad espermática sugieren que estas proteínas pueden desempeñar importantes papeles en el mantenimiento de la funcionalidad del espermatozoide. El punto de proteína identificado con el número 16 parece ejercer un efecto protector sobre la integridad de la membrana espermática, la cual es esencial para el mantenimiento de la funcionalidad del espermatozoide y es requerida para la capacitación, reacción del acrosoma y la unión del espermatozoide al oocito (Yanagimachi, 1994).

CONCLUSIONES

La adición de PPS mejoró la integridad del espermatozoide de carnero sometido a congelación.

La congelación del semen de carnero produce variaciones en el perfil de proteínas de la membrana del espermatozoide.

La identificación de proteínas de la membrana del espermatozoide envueltas en el proceso de fertilización puede ayudar en la formulación de mejores protocolos de congelación del semen.

La importancia fisiológica de estos descubrimientos justifica la realización de más estudios para identificar, caracterizar y elucidar el papel particular de cada proteína en la fisiología del espermatozoide.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue respaldado por recursos de CICYT-FEDER AGL 2004-02882, INIA RZ03-035, CICYT-FEDER AGL 2005-02614 y DGA A-26/2005. J. Cardozo fue financiado por Corpoica, Colombia. Los autores agradecen a ANGRA por el suministro de los sementales y a Santiago Morales por la colección de las muestras de semen.

REFERENCIAS

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology 21(1): 1-7.

Barrios B, Pérez-Pé R. Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology of Reproduction 63: 1531-1537.

Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. 2001. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. Molecular Human Reproduction 7(2): 113-118.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.

Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. Theriogenology 52(5): 863-873.

Cardozo JA, Fernandez-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Theriogenology 66(4): 841- 850

Desnoyers L, Therien I, Manjunath P. 1994. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular Reproduction and Development 37(4): 425-435.

Evans G, Maxwell WMC. 1987. Semen and its characteristics. Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth Scientific. pp 22-30.

Fiser PS, Ainsworth, Fairfull RV. 1987. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. Theriogenology 28(5): 599-607.

Fiser PS, Fairfull RW. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. Cryobiology 26(1): 64-69.

García-López N, Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1996. Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B 680(1-2): 137-143.

Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics 4(12): 3665-3685.

Guillaume M, Sabido O, Durand P, Levy R. 2004. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. Biology of Reproduction 71(1): 28-37.

Haden NP, Hickox JR, Whisnant CS, Hardy DM. 2000. Systematic characterization of sperm-specific membrane proteins in swine. Biology of Reproduction 63(6): 1839-1847.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. Journal of Andrology 11(1): 73-88.

Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction & Fertility 88: 343-352.

Harvey S, Zhang Y, Landry F, Miller C, Smith JW. 2001. Insights into a plasma membrane signature. Physiological Genomics 5(3): 129-136.

Holt WV, Head MF, North RD. 1992. Freeze-Induced Membrane Damage in Ram Spermatozoa Is Manifested After Thawing - Observations with Experimental Cryomicroscopy. Biology of Reproduction 46(6): 1086-1094.

Holt WV, North RD. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biology of Reproduction 51(3): 414-424.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. Theriogenology 60(4): 743-758.

Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Theriogenology 61(3): 255-266.

Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, Mattos RC. 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. Theriogenology 63(7): 2053-2062.

Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. Journal of Andrology 21(5): 700-707.

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 57(1): 327-344.

Mortarino M, Tedeschi G, Negri A, Ceciliani F, Gottardi L, Maffeo G, Ronchi S.1998. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Electrophoresis 19(5): 797-801.

Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC. 1997. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa. Biology of Reproduction 56(3): 771-787.

O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. The Journal of Biological Chemistry 250(10): 4007-4021.

Olden K, Bernard B, Humphries M, Yeo K, White S, Newton S, Bauer H, Parent J. 1985. Function of glycoprotein glycans. TIBS 110: 78-82.

Ollero M, Bescós O, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1998. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. Theriogenology 49(3): 547-555.

Ollero M, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology 37(1): 1-12.

Ollero M, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1997 Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. Journal of Andrology 18(6): 732-739.

Ollero M, García-López N, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 1997. Surface changes of ram spermatozoa by adsorption of homologous and heterologous seminal plasma proteins revealed by partition in an aqueous two-phase system. Reproduction Fertility and Development 9(4): 381-390.

Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA. 1996. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. International Journal of Andrology 19(5): 287-292.

Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Bjorndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. 2004. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report. Human Reproduction 19(6): 1438-1447.

Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Meyers SA. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. Biology Reproduction 74(2): 359-365.

Roldan ERS, Harrison RAP. 1988. Absence of active protein kinase C in ram spermatozoa. Biochemical and Biophysical Research Communication 155(2): 901-906.

Salamon S, Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 62(1-3): 77-111.

Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Topfer-Petersen E. 1993. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. Molecular Reproduction and Development 35(1): 37-43.

Souza CE, Moura A, Oliveira JT, Radis-Baptista G, Araujo A, Lima A. 2004. Seminal plasma proteins, testis development and semen criteria in the ram. In: 29th Annual Meeting ASA, p. 91.

Steponkus PL, Lynch DV. 1989. Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 21(1): 21-41.

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. Biology of Reproduction 58(3): 786-793.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science 60-61: 481-492.

Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction Fertility and Development 7(4): 871-891.

Watson PF, Kunze E, Cramer P, Hammerstedt RH. 1992. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. Journal of Andrology 13(2): 131-138.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil. E, Neil JD editors. The Physiology of Reproduction, 2nd ed. New York: Raven press p189-317.

Yoshida M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. Animal Reproduction Science 60-61: 349-355.