

## LA IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL BOVINO EN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA Y LA FERTILIDAD

### The importance of bovine seminal plasma proteins in the sperm function and fertility

María Alejandra Cardozo<sup>1</sup>, Jaime Antonio Cardozo<sup>2</sup>, Fabian Rueda<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de  
Biología Aplicada,  
Facultad de Ciencias  
Básicas y Aplicadas,  
Universidad Militar  
Nueva Granada,  
Colombia

<sup>2</sup> Centro de  
investigación  
Tibaitatá, Grupo de  
Reproducción animal  
tropical, Corporación  
Colombiana de  
Investigación  
Agropecuaria  
AGROSAVIA,  
Colombia.

\* Corresponding author:  
Fabian Rueda, e-mail:  
frueda@agrosavia.co

Recibido: 23/08/2021

Aceptado: 12/12/2021

Publicado: 31/12/2021

#### ABSTRACT

Bovine livestock is one of the most important economic and social sectors for many countries. In this sense, the development of strategies to improve reproductive bull fertility and reproduction rates is relevant. It's highlighted the role of seminal plasma proteins (SPP) in reproductive fertility, so it has found close relationships among studies on the structure and biological activity of SPP, with seminal quality, including viability, sperm motility, and morphology. In addition, they have been found to regulate sperm functions such as capacitation, acrosome reaction, and they are even related to protecting sperm against thermal and oxidative stress. Moreover, the methods of separation and protein identification and their contribution to characterizing the bovine SP proteome should be also highlighted. In this sense, the most recent studies have been directed towards developing supplements with SPP that improve quality sperm subjected to cryopreservation processes. Research has begun and should forward to establish how the networks or sets of proteins are related to the functioning and fertility of sperm, the search for biomarkers of fertility, and the use of proteins in biotechnological processes, to increase efficiency reproductive.

**Keywords:** Bovine semen, proteins, seminal plasma, seminal quality, proteomics.

#### RESUMEN

La ganadería bovina es uno de los sectores económicos y sociales más importantes para muchos países. En este sentido, cobra importancia el desarrollo de estrategias que puedan mejorar la fertilidad del toro y con ello las tasas reproductivas. En este aspecto, el papel de las proteínas del plasma seminal (PPS) en la fertilidad del reproductor destaca por su estrecha relación con funciones espermáticas específicas y parámetros de calidad seminal como la viabilidad, la motilidad y la morfología espermática. Además, se ha encontrado que están involucradas en la regulación de la capacitación espermática, la reacción acrosómica e incluso se relacionan con la protección del espermatozoide contra el estrés térmico y oxidativo. En la realización de estos estudios se resalta la importancia de los métodos de separación e identificación de proteínas y su contribución en la caracterización del proteoma del PS bovino. Adicionalmente, se resaltan los estudios más recientes encaminados hacia el desarrollo de suplementos con PPS que puedan mejorar la calidad de espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación. La investigación ha empezado y debe continuar dirigiéndose a establecer las interacciones en conjuntos de proteínas que están relacionadas con el funcionamiento y la fertilidad del espermatozoide, la búsqueda de biomarcadores de fertilidad y el uso de proteínas en procesos biotecnológicos, con el fin de incrementar la eficiencia reproductiva.

**Palabras clave:** Semen bovino, proteínas, plasma seminal, calidad seminal, proteómica.

## INTRODUCCIÓN

Una de las mayores demandas de los productores en el sector agropecuario es el desarrollo de estrategias para mejorar la fertilidad del ganado bovino. Esto es fundamental para la economía de los sistemas productivos y plantea una necesidad de investigación alrededor de herramientas biotecnológicas que contribuyan a aumentar la eficiencia reproductiva de los machos reproductores. En este sentido, buena parte de estas investigaciones se ha enfocado en el semen bovino, el cual es una mezcla de espermatozoides suspendidos en un fluido complejo denominado plasma seminal (PS) (Westfalewicz et al., 2017). El PS se forma a partir de las secreciones de los testículos, el epidídimo, las vesículas seminales y las glándulas sexuales accesorias del tracto reproductor masculino (Gwathmey et al., 2006), y se une a las células espermáticas durante la eyaculación. Este no solo es un vehículo para los espermatozoides, sino también representa una fuente de energía para mantener su actividad metabólica y motilidad (Maxwell et al., 2007), además su origen proviene de varios órganos, por lo que contiene otros componentes como iones y lípidos (Memili et al., 2020), que sugiere una función biológica compleja (Revisado en Druart y da Graaf, 2018).

Se ha descrito que tanto las proteínas del espermatozoide (Menezes et al., 2020) como las proteínas del plasma seminal (PPS) juegan un papel fundamental para que los espermatozoides logren la fecundación de los ovocitos. En los toros, las PPS son secretadas por las glándulas sexuales accesorias y se unen a la membrana plasmática del espermatozoide tras la eyaculación en un corto lapso. Se espera que estas proteínas tengan un efecto positivo sobre la función espermática, razón por la cual se requiere una alta eficiencia de esta asociación (Druart y da Graaf, 2018). Se ha descrito que participan en algunos procesos que preceden a la fertilización, como, la capacitación espermática, el establecimiento del reservorio oviductal de espermatozoides, el transporte del espermatozoide en el tracto genital femenino y la interacción de gametos (Töpfer-Petersen et al., 2005).

Dada su importancia, es fundamental entender la estructura de las proteínas y sus interacciones con ligandos específicos, así como las funciones biológicas derivadas de dichas interacciones. Esta comprensión de los mecanismos moleculares asociados con la fecundación puede usarse para el desarrollo y optimización de procesos biotecnológicos que resulten en un incremento de la eficiencia reproductiva del macho bovino.

En el desarrollo de estas herramientas biotecnológicas, varias investigaciones se han enfocado en la posibilidad de aplicar estos conocimientos para mejorar la conservación del semen fresco o congelado, así como en la búsqueda de proteínas que puedan ser empleadas como marcadores de la fertilidad. Adicionalmente, cobran importancia las investigaciones sobre la adición de PPS al semen criopreservado (Barrios et al., 2000), además de los estudios dirigidos hacia la producción de PPS de forma recombinante. Lo anterior podría contribuir con el desarrollo de medios definidos que puedan mitigar el efecto deletéreo causado por la congelación en las células espermáticas.

En esta revisión se destaca el papel de las principales PPS en la función espermática del macho bovino, así como las principales herramientas biotecnológicas que han permitido su identificación y caracterización. También se describen los estudios sobre el efecto de protección que ejercen sobre los espermatozoides ante estrés generado por la criopreservación, su producción mediante la técnica de proteínas recombinantes y finalmente las perspectivas sobre el futuro de la investigación en esta área.

### Proteínas del plasma seminal bovino

A continuación, se describen las proteínas sobre las que más investigación se ha realizado, por ser las más abundantes y por el papel que ha sido descrito juegan en el funcionamiento del espermatozoide (tabla 1). Es conveniente aclarar que existen otras proteínas cuya estructura y función biológica aún no ha sido bien definida.

**Tabla 1.** Estudios de las principales proteínas del plasma seminal. Los trabajos relacionados en la tabla se distribuyen en porcentaje por cada proteína. Se destaca además la función biológica descrita por varios autores.

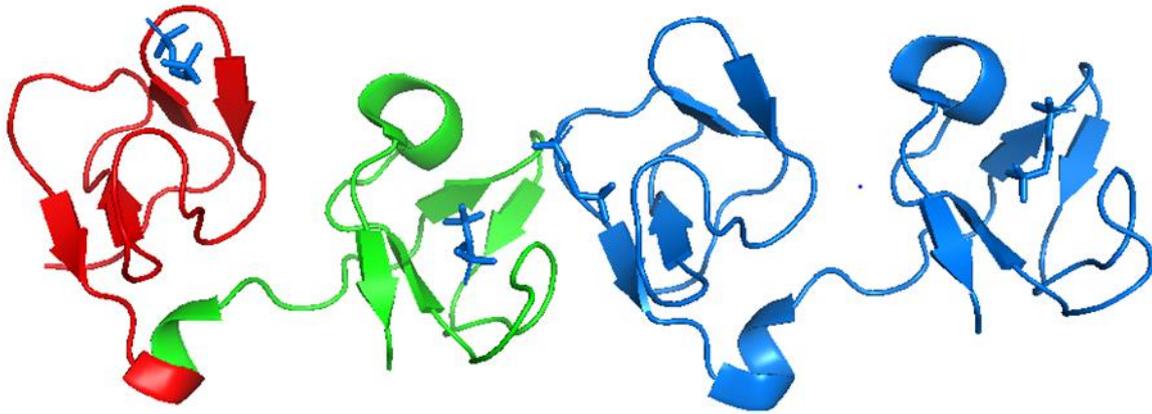
Proteínas del plasma seminal bovino	Función	Tasa de estudios encontrados*
Binder sperm proteins BSP	Participan en la capacitación y la reacción acrosómica. Muestran actividades de unión a heparina y fosfolípidos.	6.2%
Espermadhesinas	Presentan función antioxidante y se asocian con la motilidad espermática.	4.3%
Albúmina	Protege al espermatozoide del daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno (ROS). Modula la salida de colesterol de la membrana plasmática durante la capacitación.	66.5%
Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasa	Se asocia a las membranas espermáticas y desempeña un papel importante en la regulación de la fertilidad.	3.4%
Osteopontina	Se asocia a los espermatozoides durante la eyaculación y evita el estrés oxidativo.	4.4%
Clusterina	Se caracteriza por tener actividad de chaperona al interactuar con diferentes proteínas. También posee actividad antioxidante.	15.2%

\*La estrategia de búsqueda involucró las siguientes bases de datos: Scholar Google, Science direct, Pubmed y Scopus.

### Binder Sperm Proteins (BSP)

Las proteínas más abundantes del PS bovino son las BSP. Estas son una familia de proteínas de unión a heparina, secretadas por las vesículas seminales y constituyen el 60% de las PPS totales (Moura et al., 2007). Poseen una estructura secundaria compuesta por un dominio N-terminal variable, seguido de dos

dominios de fibronectina tipo II (figura 1) (Manjunath et al., 2009). Las BSP incluyen BSP1 (BSP-A1/-A2 o PDC-109) y BSP3 (BSP-A3) que poseen masas moleculares entre 15-16.5 kDa, mientras que BSP5 (BSP-30kDa) tiene una masa molecular de 28-30 kDa (Manjunath et al., 2009).



**Figura 1.** Estructura secundaria de BSP1 (PDB código 1H8P) que muestra el dominio de fibronectina tipo II 1 en color rojo y el dominio de fibronectina tipo II 2 en color verde. Tomado de: Wah et al. (2002) y creada con Pymol versión 2.5.

Todas las proteínas de esta familia están glicosiladas con excepción de BSP3 (Manjunath et al., 1989; Desnoyers et al., 1994; Jois et al., 2015). Las proteínas BSP-A1 y BSP-A2 tienen la misma estructura primaria, pero difieren en el grado de glicosilación (Esch et al., 1983). BSP-A1 y BSP-A2 forman un complejo denominado PDC-109 actualmente llamado BSP1 que corresponde entre 25–47% de la fracción proteica total (Nauc y Manjunath, 2000). Por su parte, se ha demostrado que la glicosilación juega un papel fundamental en el aumento de la actividad chaperona de esta proteína (Singh et al., 2020). Las BSP inducen el flujo de la salida de colesterol al momento de la eyaculación cuando los espermatozoides quedan expuestos al líquido seminal (Srivastava et al., 2013). A su vez, se ha descrito que interactúan con lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentes en el tracto reproductor de la hembra, lo que estimula un segundo flujo de colesterol y provoca un aumento en la fluidez de la membrana espermática (Jois et al., 2015). Adicionalmente, las proteínas BSP juegan un papel importante en la captación de  $Ca^{2+}$ , en la alcalinización intracelular y en la fosforilación de la tirosina que ocurren durante la capacitación (Thérien et al., 2005).

Por otra parte, las BSP tienen la función de regular la capacitación espermática, por lo que la exposición continua de los espermatozoides a estas proteínas durante la criopreservación puede ser perjudicial para la membrana espermática debido a que la salida de lípidos resulta en una desestabilización de la membrana. Las BSP pueden actuar como factores beneficiosos o perjudiciales para los espermatozoides, y esto depende de su concentración y el tiempo de exposición (Manjunath et al., 2002; Druart et al., 2019). En este sentido, Magalhães et al. (2016) reportaron la presencia de más de dos isoformas de BSP1 que podrían estar potencialmente involucradas en diferentes etapas de los mecanismos fisiológicos relacionados con la reproducción y la criopreservación. La BSP1 se produce como una mezcla de varias isoformas (Magalhães et al., 2016), y las variaciones

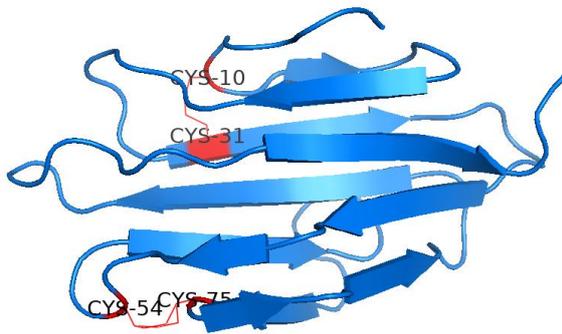
por las modificaciones postraduccionales pueden ser responsables de las propiedades funcionales de BSP1. De esta forma, la BSP1 puede mejorar la motilidad (Gwathmey et al., 2006), pero también provoca aumentos en la salida de colesterol de los espermatozoides, lo que resulta en lesiones en la membrana espermática durante el proceso de criopreservación (Srivastava et al., 2013).

### Espermadesinas

Las espermadesinas son un grupo de proteínas de 12-16 kDa que se encuentran en el PS y se adhieren a la superficie de los espermatozoides. Están involucradas en diversos procesos como la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida. En el PS bovino se han descrito las espermadesinas  $\alpha$ SFP (SPDAH1) y Z13 (SPDAH2) (Wempe et al., 1992). La proteína ácida del fluido seminal ( $\alpha$ SFP) es un polipéptido no glicosilado de 13 kDa sintetizado por la ampolla del conducto deferente y el epitelio de la vesícula seminal en concentraciones de aproximadamente 2-7 mg/mL (Einspanier et al., 1993). Contiene 114 residuos de aminoácidos (figura 2), además de dos enlaces disulfuro intramoleculares ubicados entre cuatro residuos de cisteínas adyacentes (Cys10-Cys31 y Cys54-Cys75) (Einspanier et al., 1994).

La  $\alpha$ SFP bovina comparte hasta el 50% de homología con los miembros de la familia de las espermadesinas pero presenta importantes diferencias en su función biológica por su incapacidad para unirse a los carbohidratos o a la zona pelúcida (Dostálová et al., 1994). Se ha encontrado que la  $\alpha$ SFP presenta una función antioxidante debido a que puede reducir la peroxidación lipídica, de tal manera que protege la membrana plasmática de los espermatozoides ante el ataque de las especies reactivas de oxígeno (ROS), regula la actividad mitocondrial y reduce el metabolismo (Magalhães et al., 2016). La protección de la membrana plasmática puede deberse a la estructura única de la  $\alpha$ SFP, en la que al menos uno de los dos puentes disulfuro que posee, está activo durante

la función de las reacciones redox y en el potencial antioxidante (Schoneck et al., 1995).



**Figura 2.** Estructura secundaria de aSFP (PDB código 1SFP) que muestra en color rojo los dos enlaces disulfuro ubicados entre residuos de cisteínas adyacentes. Tomado de: Romero et al. (1997) y creada con Pymol versión 2.5.

En cuanto a la espermedesina Z13, se conoce que está formada por dos subunidades de 13 kDa unidas por dos puentes disulfuro que no presenta glicosilación (Tedeschi et al., 2000). Presenta un dominio CUB, y los residuos Cys14-Cys35 y Cys58-Cys79 unidos con dos enlaces disulfuro intracadena, y Cys89 está involucrado en un puente S-S entre cadena y es responsable de la dimerización de la proteína. Este quinto residuo de Cys89 solo se encuentra presente en Z13 y no en las otras proteínas pertenecientes a la familia de las espermedesinas (Tedeschi et al., 2000).

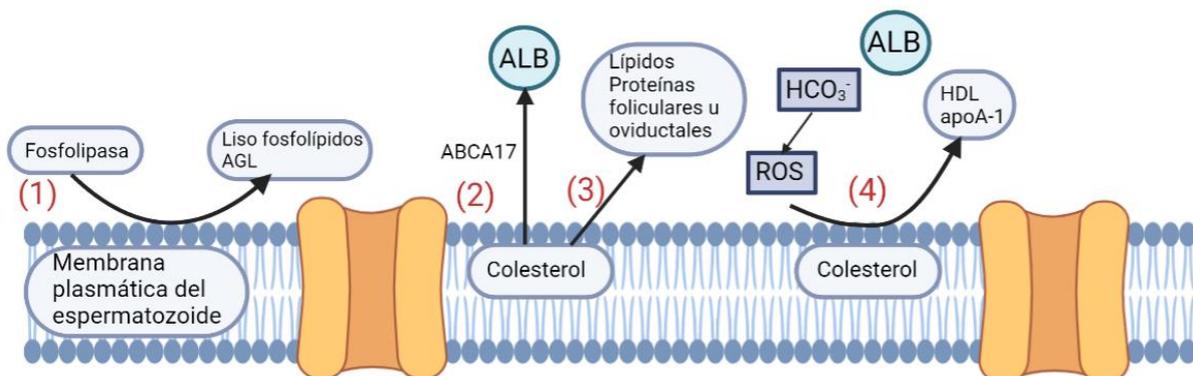
Los primeros estudios realizados mostraron asociaciones inversas entre la fertilidad y la expresión de la proteína Z13 en el PS de toros, por lo que se ha reportado como un factor

de anti fertilidad (Killian et al., 1993; Moura et al., 2006). Estos autores destacan que los resultados in vitro dependen de las dosis utilizadas. Estudios recientes demuestran que Z13 tiene alta relación con la fertilidad en bovinos (Willfors et al., 2021), lo que coincide con observaciones previas de Menezes et al. (2017), en donde se reportó que las espermedesinas se asocian positivamente con la motilidad de los espermatozoides descongelados. Otros estudios evidenciaron la presencia de diferentes isoformas de espermedesinas en el PS bovino que presentan modificaciones postraduccionales que podrían implicar diferentes patrones de glicosilación. Estos estudios sugieren que los patrones de glicosilación de las espermedesinas en toros, podrían explicar sus efectos en la motilidad de los espermatozoides (Menezes et al., 2017).

### Albúmina

La albúmina seminal bovina (ALB) es una proteína con peso molecular de 66.0 – 69.9 kDa y punto Isoeléctrico de 5.7 a 6.6 (Rego et al., 2014), que se produce en menor cantidad en las glándulas sexuales accesorias (Menezes et al., 2017). La ALB inhibe la dismutación del anión superóxido que causa la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y absorbe especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que sugiere un efecto protector de la membrana espermática (Armstrong et al., 1998). En este sentido, el estudio de Kasimanickam et al. (2019) plantea que, en toros de baja fertilidad, concentraciones bajas de ALB provocan una mayor producción de ROS, lo que contribuye a una mala calidad seminal.

También se ha comprobado que la ALB modula la salida de colesterol de la membrana plasmática durante la capacitación espermática (figura 3) (Visconti y Kopf, 1998) y la reacción del acrosoma. La ALB remueve colesterol de la membrana espermática, lo que provoca la capacitación del espermatozoide (Aitken y Nixon, 2013).



**Figura 3.** Salida de colesterol mediada por la ALB. La fosfolipasa provoca ruptura de la membrana de los lípidos y produce liso-fosfolípidos y ácidos grasos libres (AGL), el acumulo de liso-fosfolípidos afecta la membrana acrosomal externa y se une a la membrana plasmática para iniciar la reacción acrosómica (Singleton y Killian, 1983). 2. El colesterol liberado es removido por la ALB, a través de un transportador (ABCA17) 3. El colesterol puede unirse a lípidos y proteínas presentes en fluido folicular u oviductal. 4. El estrés oxidativo es el principal causante de la salida del colesterol, el proceso requiere HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para generar ROS, que provoca la oxidación de los esteroides y el aumento de la hidrofiliidad de los productos de la oxidación facilita su transferencia a la ALB (Brouwers et al., 2011).

### Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas TIMPs

Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) son una familia de cuatro proteínas (TIMP-1, 2, 3 y 4). Se encargan de inhibir la actividad catalítica de las metaloproteinasas (MMPs) (De Clerck et al., 1989) y presentan una estructura primaria

muy conservada. Las MMPs son proteasas que contienen un cofactor catalítico de Zn<sup>2+</sup> y están involucradas en la degradación de componentes proteicos de la matriz extracelular (ECM) (Nagase et al., 2006), proceso fundamental para el desarrollo embrionario, la morfogénesis y la

remodelación tisular. En bovinos, TIMP-2 es una proteína no glicosilada que presenta una masa molecular de 24 kDa y ha sido detectada en los espermatozoides eyaculados y en el PS (McCauley et al., 2001). El estudio de McCauley et al. (2001), sugiere que TIMP-2 está asociada a las membranas espermáticas y desempeña un papel importante en la regulación de la fertilidad del toro, probablemente al interactuar con MMP-2 y participar en la remodelación de la membrana basal (Longin et al., 2001). En este sentido, TIMP-2 libre se encarga de inhibir la activación de MMP-2, lo que evita la degradación de la matriz extracelular y las membranas basales.

La expresión de MMP-2 y TIMP-2 depende de la hormona estimulante folicular (FSH). Al respecto se ha descrito que el tratamiento con FSH aumenta la expresión de estas proteínas, lo que evidencia su participación en la espermatogénesis. En este sentido, el estudio de Pereira et al. (2020) plantea que el uso de TIMP-2 en el PS como biomarcador para el seguimiento de la espermatogénesis, podría mejorar la selección de toros en los programas de reproducción.

### Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una glicoproteína ácida altamente fosforilada con una masa molecular de 55kDa, secretada por las glándulas de la ampolla y las glándulas vesiculares. La OPN bovina tiene 22 aminoácidos menos que las otras especies, lo que según Prince (1989) se debe a la falta del sitio de unión potencial de Ca<sup>2+</sup>. El estudio de Erikson et al. (2007), señala que la cantidad de OPN en el esperma bovino eyaculado es mayor que en el esperma epididimario, lo que sugiere que esta proteína se asocia con los espermatozoides durante la eyaculación. En este sentido, el estudio de Bustamante-Filho et al. (2021) plantea que la secreción de OPN en los órganos reproductores masculinos y su presencia en el PS sugiere su participación en la fisiología del espermatozoide. En tanto, el estudio de Cancel et al. (1999), señala que la OPN tiene una influencia positiva sobre la fertilidad en toros debido a que protege la superficie epitelial de las glándulas sexuales accesorias de infecciones bacterianas, y es capaz de modificar las características de la membrana plasmática de los espermatozoides. Se plantea que la secreción de OPN por las glándulas accesorias contribuye indirectamente a evitar el estrés oxidativo, la pérdida de la función y el daño del ADN de los espermatozoides (Bustamante-Filho et al., 2021). También se asocia con la calidad seminal debido a que niveles altos de OPN en el PS podrían desencadenar hiperactivación, lo que da como resultado, un aumento de la motilidad total de los espermatozoides (Bustamante-Filho et al., 2021).

La OPN, media la unión de espermatozoides-óvulo a través de receptores de la familia integrina y glucoproteínas transmembranales CD44 (Souza et al., 2008). La OPN se une a las integrinas  $\alpha v$  y  $\alpha 5$  que han sido identificadas en espermatozoides, por medio del péptido de reconocimiento RGD, que se encarga de promover la unión célula-célula (Gonçalves et al., 2007), Mientras que CD44 es un receptor de ácido hialurónico detectado en el oviducto bovino (Schoenfelder y Einspanier, 2003).

Se conoce también la interacción de OPN con otras moléculas como los glicosaminoglicanos (GAG) encargados de inducir la capacitación espermática y la reacción acrosómica en varias

especies (Thérien et al., 1999). La capacidad que tiene OPN de unirse a GAG explicaría su participación en la fertilidad de los bovinos, debido la modulación de GAG, en especial en el oviducto, lugar donde se expresa OPN (Liu et al., 2014). De esta manera, Bustamante-Filho et al. (2021) exponen la capacidad de OPN para unirse a diferentes proteínas y moléculas que están directamente involucradas en la fertilización. Estos trabajos han reforzado su importancia en la fertilidad bovina al punto de convertirse en una de las más fuertes candidatas para ser consideradas como un biomarcador de fertilidad en toros.

### Clusterina

La clusterina (CLU) es una glicoproteína con un peso molecular de 75-80 kDa. Contiene dos dominios de cadena  $\alpha$  y cadena  $\beta$  (Essabani et al., 2010) con pesos moleculares de 38 y 36 kDa respectivamente. En bovinos, es producida por las células de Sertoli (Mishra et al., 2013). Existen dos isoformas de CLU que se asocian a la membrana espermática en distintas localizaciones, diferenciadas principalmente por las modificaciones postraduccionales. Cada una desempeña un papel fundamental en la diferenciación y maduración de los espermatozoides (Howes et al., 1998; Ibrahim et al., 1999). Adicionalmente, CLU está involucrada en el transporte de lípidos, la adhesión celular, la remodelación de los tejidos y la maduración espermática (Jones y Jomary, 2002). Respecto a la actividad antioxidante, se ha demostrado que se une a la superficie del espermatozoide en el epidídimo bovino como un factor protector, lo que evita la peroxidación lipídica (Reyes-Moreno et al., 2002). Numerosos estudios involucran a CLU con baja fertilidad en toros, dado que correlaciona positivamente con espermatozoides morfológicamente anormales y con baja motilidad (Shojaei Saadi et al., 2013; Viana et al., 2018). Lo anterior puede deberse a la capacidad de CLU para unirse a las porciones dañadas de las regiones hidrófobas de la membrana del espermatozoide (Bailey y Griswold, 1999). Así mismo, se determinó que la CLU interactúa con diversas moléculas que se encuentran en los espermatozoides y el tracto reproductivo, como ALB, TIMP, alfa-2-HS-glicoproteína y con la proteína de unión a galectina-3, otra proteína que se encuentra abundante en el PS de toros con baja fertilidad (Viana et al., 2018)

### Proteínas del plasma seminal y su relación con la calidad seminal

Un aspecto que ha sido objeto de múltiples investigaciones es la predicción de la fertilidad de un toro reproductor. El éxito de la fertilización no puede atribuirse solamente al número de espermatozoides aparentemente normales que se colocan en el tracto de la hembra, sino más especialmente a la competencia funcional del espermatozoide (Petrunkina et al., 2007). Además, la calidad del espermatozoide es fundamental para garantizar el éxito de la fertilidad, es decir, los cambios morfofuncionales y moleculares podrían afectar la capacidad fecundante del macho (Alves et al., 2021).

Según lo anterior, las investigaciones se han centrado en el desarrollo y optimización de métodos como el análisis seminal asistido por computador (CASA), la prueba de resistencia osmótica (HOST TEST), la determinación de la integridad de la membrana, la evaluación del estado del acrosoma, el estado de la mitocondria y la prueba de integridad del ADN (Petrunkina et al., 2007). A pesar de que estas técnicas explican algunas de las variaciones en la fertilidad individual,

en ocasiones no reflejan los resultados de la fertilidad en campo, debido a que no tienen en cuenta aspectos moleculares relacionados con aspectos como la capacitación espermática, la reacción acrosómica, el reconocimiento de la zona pelúcida y la penetración del ovocito. En este sentido, las investigaciones sobre el papel de las proteínas en la función espermática han permitido explicar en parte las variaciones en los parámetros de calidad seminal que pueden incidir en la fertilidad.

#### **Relación entre las proteínas del plasma seminal y la motilidad espermática**

La motilidad espermática y la capacidad de unirse a la zona pelúcida se adquieren en la cola del epidídimo (Druart y de Graaf, 2018). La motilidad progresiva refleja el estado fisiológico del espermatozoide después de la colecta y/o de la criopreservación. Varias de las PPS tienen papeles sobre la motilidad del espermatozoide y una de ellas es la BSP1 (Srivastava et al., 2013). Se ha reportado que las BSP evidencian ciertas funciones que ayudan a prolongar la sobrevivencia y la motilidad del espermatozoide en el oviducto (Gwathmey et al., 2006).

En cuanto a la aSFP, se sabe que antes de la eyaculación el espermatozoide se almacena temporalmente en la ampolla, donde la presencia de altos niveles de aSFP restringen su motilidad, por lo que actúa como un mecanismo de conservación de energía (Schoneck et al., 1995). Posteriormente en el tracto reproductor femenino pierde su adherencia al espermatozoide por efecto de la dilución, por lo cual el espermatozoide recobra su motilidad (Dostálová et al., 1994).

Por otra parte, el estudio de Bustamante-Filho et al. (2021), considera que niveles más altos de OPN en el PS bovino, podrían desencadenar una hiperactivación, lo que resulta en un aumento de la motilidad total de los espermatozoides.

De otro lado, la enzima convertidora de angiotensina es otra proteína del PS, cataliza la formación de angiotensina II y se une a los receptores en el espermatozoide e incrementa la motilidad espermática; así mismo la inhibición de su actividad en el PS disminuye la motilidad progresiva (Bustamante-Filho et al., 2021).

Otras proteínas se han relacionado negativamente con la motilidad espermática. Es el caso de la espermadhesina Z13 (Moura et al., 2006) y la CLU (Ibrahim et al., 1999). En condiciones *in vitro* se ha demostrado que altos niveles de la proteína inhiben la actividad mitocondrial y por consiguiente la motilidad (Schoneck et al., 1995).

#### **Viabilidad de la membrana espermática y proteínas del plasma seminal**

La membrana del espermatozoide tiene un importante papel en la fecundación, por lo que la evaluación de su integridad es esencial para estimar la fertilidad de un reproductor. La membrana plasmática es una estructura estable y metabólicamente inerte por lo que proteínas, fosfolípidos y otros componentes no pueden ser sintetizados nuevamente si se pierden (Flesch y Gadella, 2000). Una de características de la membrana espermática es la flexibilidad de su estructura, lo que le permite adaptarse a los diferentes cambios que sufre el espermatozoide en procesos como la capacitación y la interacción con la zona pelúcida y la fecundación del ovocito. Estos cambios evidencian procesos de reorganización de las

moléculas que la componen (fluidez de la membrana) proceso que es apoyado por proteínas específicas del PS. Son varias las PPS que se relacionan con mantener la integridad de la membrana del espermatozoide en algún momento de su vida, como la aSFP, de la cual se ha descrito que protege la membrana espermática del daño oxidativo al reducir la peroxidación lipídica debido al equilibrio redox que exhiben los residuos de cisteína Cys54 y Cys75 (Schoneck et al., 1995). La ALB, por su parte, ejerce una acción capacitante durante la criopreservación, su papel como aceptora de colesterol le permite removerlo de la membrana espermática en la capacitación del espermatozoide (Aitken y Nixon, 2013), los esteroides pueden ser oxidados durante la criopreservación, y el incremento de la hidrofobicidad de los productos de la oxidación facilita su transferencia a la ALB (Brouwers et al., 2011).

La TIMP2, por su parte, inhibe de la actividad de las metaloproteinasas (Brouwers et al., 2011) y participa en la remodelación de la membrana basal (McCauley et al., 2001). TIMP-2 libre se encarga de inhibir la activación de MMP-2 y evitar la degradación de la matriz extracelular y las membranas basales.

#### **Morfología espermática y las proteínas del plasma seminal**

Algunas PPS presentan efectos positivos o negativos sobre el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (Boe-Hansen et al., 2015). Es el caso de la apolipoproteína A1 (ApoA1) y la fosfoglicerato quinasa, las cuales se encontraron en el PS de toros Brahman y se asociaron positivamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

En el 2014 Rego et al. reportaron la presencia de fosfoglicerato quinasa 1 en PS de toros Brahman, mientras que, Kelly et al. (2006) reportaron fosfoglicerato quinasa en PS de toros Bos Taurus. Con respecto a la fosfoglicerato quinasa 2, es una enzima que participa, en la primera reacción de la glicólisis para la producción de ATP (Eddy et al., 2003). La ausencia de fosfoglicerato quinasa 2, reduce marcadamente la motilidad espermática y los niveles de ATP (Danshina et al., 2010).

Por su parte, la CLU afecta negativamente la morfología del espermatozoide en toros Brahman (Boe-Hansen et al., 2015). En un estudio con toros Holstein se encontró una asociación entre espermatozoides con cabezas morfológicamente anormales (espermatozoides piriformes) y un incremento en la expresión de la CLU sobre la membrana del espermatozoide (Shojaei Saadi et al., 2013), por lo que se ha sugerido que la CLU es un indicador de semen de pobre calidad.

#### **Proteínas del plasma seminal y criopreservación del semen**

La criopreservación de semen es una herramienta frecuentemente usada para optimizar las tasas de reproducción, bien sea de especies de interés productivo o para la conservación de especies en peligro de extinción. A pesar de las ventajas, esta técnica afecta la fisiología y la morfología de los espermatozoides debido al estrés térmico causado por los cambios de temperatura, la congelación y la descongelación; el estrés osmótico generado por la adición de los agentes crioprotectores (Chantler y Abraham-Peskir, 2004), y el estrés oxidativo debido a las ROS generadas por la peroxidación lipídica de las membranas espermáticas (Aitken y Fisher, 1994). Dichos procesos traen como consecuencia una

disminución de la concentración intracelular de cAMP que implican cambios en la función mitocondrial y disminución en la producción de ATP (Pons-Rejraji et al., 2009). Lo anterior desencadena un fenómeno conocido como capacitación prematura, durante el cual los espermatozoides muestran tasas metabólicas elevadas, un incremento de la fluidez y permeabilidad de la membrana y reacción acrosómica espontánea (Cormier et al., 1997). Esto provoca la reducción gradual de la motilidad de los espermatozoides y una pérdida de la viabilidad de más del 50 % (Khalil et al., 2018).

En este sentido, los estudios han encontrado que las PPS tienen una estrecha relación con la "congelabilidad" de los espermatozoides, entendida como la capacidad de las células para mantener su integridad y funcionalidad después de un proceso de criopreservación (Roncoletta et al., 1999). Por ejemplo, los resultados obtenidos por Rueda et al. (2013), sugieren que las proteínas de bajo peso molecular del PS intervienen en la recuperación de la membrana del espermatozoide bovino sometido a criopreservación, lo anterior debido a que se logra una recuperación del porcentaje de espermatozoides viables de alrededor de 15%, cuando se incuban con PPS de bajo peso molecular.

Por su parte, a través de electroforesis 2D-PAGE se han detectado una serie de PPS relacionadas con alta y baja congelabilidad, establecida por la calidad seminal post-descongelación (Jobim et al., 2003; Jobim et al., 2004; Jobim et al., 2009). En toros con semen de alta congelabilidad se detectaron relaciones con BSP1 (PDC-109), aSFP, CLU y ALB, mientras que la proteína prostaglandina D sintetasa (PGDS) se detectó en toros con semen de baja congelación.

Al respecto se ha reportado que la criopreservación eleva la unión de BSP1, BSP3 Y BSP5 al espermatozoide (Ardon y Suarez, 2013), que puede deberse al incremento de los sitios de unión en la membrana del espermatozoide para las BSP, por pérdida de proteínas de la membrana espermática ocasionadas por la criopreservación (Ardon y Suarez 2013). Por su parte en el estudio de Jobim et al. (2009), se demostró que las muestras de animales reproductores con alta congelabilidad, contienen mayor cantidad de BSP, que podría conferir una mayor preservación de las propiedades de la membrana espermática durante la congelación de semen. De otro lado, la alta relación entre la congelabilidad del espermatozoide y la aSFP, puede explicarse por sus efectos sobre frente a la peroxidación oxidativa. En el estudio de Jobim et al. (2003) se observó que estuvo presente en el 90% de los reproductores con mayor congelabilidad y se relacionó con la supervivencia del espermatozoide (Revisado en Pardede et al., 2020).

Con respecto a la CLU, se ha reportado que su ubicación en la membrana espermática y su papel en el transporte y redistribución de lípidos, le pueden brindar funciones biológicas similares a las BSP, relacionadas con la protección de la membrana espermática durante la criopreservación del semen (Jobim et al., 2004).

#### **Identificación y separación de proteínas del plasma seminal en bovinos**

En las últimas tres décadas, la aplicación de técnicas de análisis proteómico ha contribuido a la identificación de las funciones y cambios en la estructura de las proteínas, así como las

interacciones con otras proteínas que se encargan de modular los procesos fisiológicos de los espermatozoides, como la hiperactivación de la motilidad, la capacitación y la reacción del acrosoma (Strzezek et al., 2005).

#### **Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE y 2D PAGE**

Una de las técnicas comúnmente utilizada en el análisis proteómico es la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El procedimiento permite separar proteínas por su peso molecular y fue desarrollado por Laemmli en el año 1970. La SDS-PAGE permitió, por ejemplo, el reconocimiento de PPS con unión a heparina en toros Nelore (Fernandes et al., 2009), e identificó 8 bandas de PPS con pesos moleculares que iban de 250 a 15 kDa de las cuales se logró establecer su afinidad por las membranas plasmáticas y su participación en la capacitación espermática. La SDS-PAGE fue una de las primeras técnicas utilizadas para los estudios proteómicos, sin embargo, este procedimiento sólo permite identificar las proteínas de acuerdo con su peso molecular, lo que representa una gran limitación ya que muchas proteínas pueden tener el mismo peso molecular (Wittig y Schagger, 2008).

Por su parte, la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) es una técnica ampliamente utilizada para separar mezclas complejas de proteínas que soluciona el problema de resolución de la electroforesis 1D, debido a que se basa en la separación de las proteínas de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI), peso molecular, solubilidad y abundancia relativa (Görg et al., 2004). Así mismo, su aplicación da como resultado un mapa de proteínas que refleja cambios a nivel de expresión, isoformas e incluso en algunos casos modificaciones postraduccionales (Görg et al., 2004). Con esta técnica, la separación de proteínas permite detectar un número máximo de spots o "manchas", sin la presencia de proteínas múltiples por spot (Görg et al., 2000). Se reportan varios estudios que utilizan la electroforesis 2D-PAGE, para demostrar que algunas PPS de especies bovinas se asocian a toros de alta o baja fertilidad, lo que permite identificarlas como posibles marcadores de fertilidad (Kelly et al., 2006; Jobim et al., 2004; Moura et al., 2007; Sarsaifi et al., 2015). Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones cuando se trata de identificar proteínas hidrófobas, altamente cargadas y de baja abundancia.

#### **Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas (MS) es uno de los métodos de mayor elección para la identificación de proteínas debido a que permite el análisis de péptidos en mezclas complejas. La identificación por MS se basa en el análisis de péptidos generados por digestión proteolítica, lo que permite su ionización y posterior detección como iones positivos (Baldwin, 2004). Los iones producidos se separan por su relación masa/carga (m/z) y los datos se registran como "espectros" que muestran la intensidad de los iones (Wasinger y Cortals, 2002). Por este método se pueden realizar comparaciones entre proteomas de plasma seminal fisiológicos y patológicos lo que contribuye a la identificación de marcadores relacionados con el normal funcionamiento del esperma. (Druart y da Graaf, 2018).

En el estudio de Westfalewicz et al. (2017) se describió por primera vez el proteoma del líquido de la vesícula seminal del

toro por medio de la técnica MALDI-TOF, y se identificaron 12 de las 13 proteínas que habían reportado años atrás Moura et al. (2007) mediante 2D-PAGE.

Este método presenta algunas limitaciones con proteínas con bajo peso molecular debido a que liberan pocos péptidos, lo que dificulta su identificación. Lo anterior se ha resuelto con tecnologías como TOF-TOF (Garbis et al., 2005), que permite la ionización de MALDI con espectrometría de masas en tándem, en un instrumento de tiempo de vuelo para analizar péptidos con mayor rango de tamaños. Este método se utilizó en el estudio de Sarsaifi et al. (2015), en el cual se realizó la separación inicial de PPS del toro de Bali (*Bos javanicus*) por medio de 2D-PAGE, y se detectaron cerca de 116 puntos de 10 a 250 kDa. De estos resultados, se analizaron 40 puntos de péptidos por MALDI-TOF/TOF-MS / MS de los cuales se lograron identificar 29. Este análisis indicó que los toros con baja calidad seminal se correlacionaron positivamente con la expresión de las isoformas BSP1 de 16 kDa.

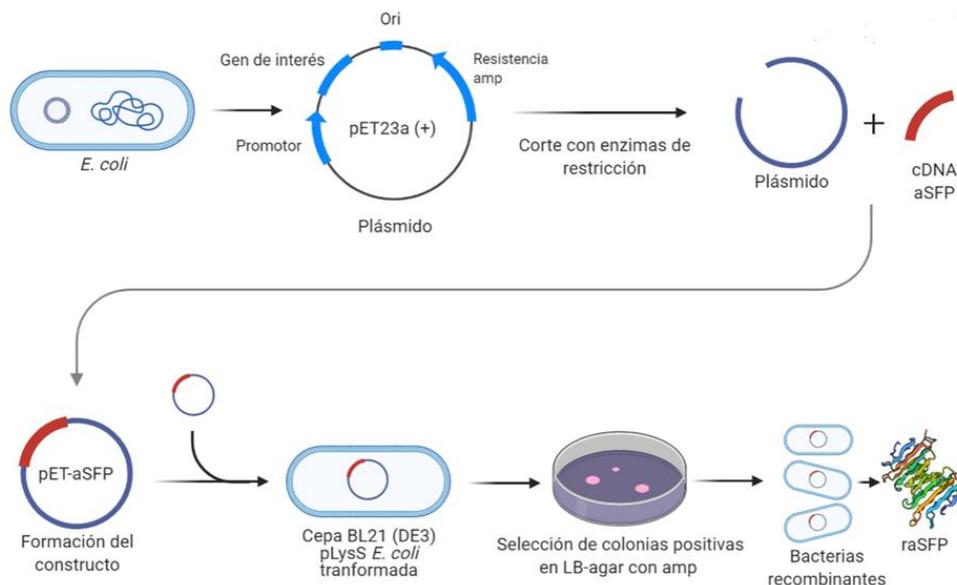
El segundo enfoque de la MS es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS / MS), una técnica utilizada para el estudio de mezclas de proteínas, que permite una identificación en sistemas biológicos complejos como el PS (Viana et al., 2018). Esta técnica combina la separación física de péptidos con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Mitulović y Mechtler, 2006). Por ejemplo, el estudio de Viana et al. (2018), utilizó espectrometría de masas acoplada con nano-HPLC con el fin de caracterizar el proteoma del PS de toros Holstein, lo que permitió la identificación de 1.159 proteínas. Un estudio más reciente utilizó la LC-MS para identificar 1.445 PPS, lo que representa el mayor conjunto de datos en PS de toros. Se encontró que las BSPs y las espermadesinas fueron las proteínas más abundantes (Gomes et al., 2020).

Más recientemente, los esfuerzos de la proteómica para la cuantificación de proteínas de mezclas complejas mediante la MS, han resultado en el uso de las etiquetas isobáricas en la

técnica de iTRAQ (Ross et al., 2004). El principio de la tecnología iTRAQ es la derivatización química de mezclas de péptidos proteolíticos que utiliza N-hidroxisuccinimida (NHS) para los grupos amino libres (Unwin, 2010). En el estudio de D'Amours et al. (2018) sometieron semen bovino criopreservado a centrifugación en gradiente de Percoll, y encontraron que los espermatozoides se distribuyen en una población de baja densidad con baja motilidad y una población de alta densidad con alta motilidad. Posteriormente se utilizó la tecnología iTRAQ para comparar cuantitativamente las diferentes densidades de los proteomas del esperma. Este estudio comprobó que las proteínas con mayor abundancia en el grupo de alta fertilidad se relacionan con el metabolismo energético, mientras las proteínas con mayor abundancia en el grupo de baja fertilidad son indicadores de problemas en el tracto genital del macho. A pesar de las múltiples fortalezas de la técnica iTRAQ, los estudios cuantitativos de mezclas complejas se convierten en un gran desafío debido a que producen una gran cantidad de péptidos que generan interferencias en el análisis de los espectros (Hultin-Rosenberg et al., 2013).

#### Producción de proteínas heterólogas o recombinantes

En biotecnología reproductiva, los estudios recientes se han enfocado hacia el uso de PPS producidas de forma recombinante para aumentar la fertilidad durante la inseminación artificial (Alvarez-Gallardo et al., 2013). Las proteínas relacionadas con la alta fertilidad pueden aislarse y purificarse para usarse en extensores y contribuir a la supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación (Druart et al., 2019), lo que demuestra que una proteína heteróloga puede proteger, prevenir y/o disminuir algunos de los efectos nocivos producidos por la criopreservación (Zalazar et al., 2016). De estos estudios, se destaca el trabajo de Bustamante-Filho et al. (2014) como el primer estudio que logró con éxito la expresión recombinante y posterior purificación de la proteína aSFP bovina a partir del plásmido pET23a(+) en *E. coli* BL21 (DE3) (Fig. 4).



**Figura 4.** Producción heteróloga de aSFP bovina según el procedimiento de Bustamante-Filho et al. (2014). Las secuencias de la aSFP fueron clonadas en el plásmido pET23a (+) con resistencia a la ampicilina (amp) para selección de colonias positivas. Los constructos resultantes fueron usados para transformar la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

Por su parte, el estudio de Singh et al. (2020), reportó la producción de BSP-A2. De acuerdo con el perfil de expresión, esta proteína recombinante (rBSP-A2) precipita como cuerpos de inclusión por la presencia de múltiples enlaces disulfuro en su estructura. Respecto a su funcionalidad, se reportó que rBSP-A2 es más eficiente para inducir la salida de lípidos de la membrana que la BSP1 (PDC-109).

En un estudio más reciente Bustamante-Filho et al. (2021) expresaron la OPN recombinante clonada de cDNA extraído de la glándula vesicular bovina. Sin embargo, los resultados sobre el efecto de la OPN recombinante en espermatozoides bovinos requieren más experimentación.

Finalmente, dado que varias de las funciones biológicas descritas para las PPS bovino dependen en parte de modificaciones post-traduccionales más complejas como la glicosilación o fosforilación, una alternativa puede ser expresar estas proteínas en sistemas heterólogos como células de insectos o mamíferos.

## CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los estudios proteómicos han permitido profundizar en el conocimiento del complejo fenómeno de la reproducción, desde el punto de vista molecular. Se han enfocado a encontrar proteínas específicas (biomarcadores) relacionadas con la fertilidad del animal, con la motilidad, viabilidad y morfología del espermatozoide, así como también proteínas relacionadas con la maduración del espermatozoide a nivel del epidídimo y de su comportamiento a nivel del tracto reproductor femenino. Al respecto, la proteómica también ha permitido comprender de una forma más clara los mecanismos moleculares envueltos en los problemas de la fertilidad del macho, los cuales están relacionados con el mal funcionamiento del espermatozoide. Desde esta perspectiva molecular, la proteómica se convierte en una herramienta de diagnóstico que puede ser involucrada en la identificación de individuos de alta y baja fertilidad. Así mismo, esta herramienta puede conducir también al desarrollo de terapias tendientes a solucionar los problemas de infertilidad en el macho, a encontrar proteínas que protejan al espermatozoide en el proceso de criopreservación y que puedan usarse como aditivos en los medios de congelación, lo que puede contribuir con el desarrollo de tecnologías reproductivas y mejorar la eficiencia de la reproducción asistida.

En este sentido, los investigadores alrededor del mundo coinciden en que los nuevos trabajos deben dirigirse a establecer redes o conjuntos de proteínas relacionadas con el funcionamiento y la fertilidad del espermatozoide, la búsqueda de biomarcadores para la selección de machos fértiles, la identificación y uso de proteínas relacionadas con la protección del espermatozoide ante eventos estresantes, y el uso de proteínas en procesos biotecnológicos. La búsqueda de biomarcadores en el PS, y su posterior uso en la selección de toros de alta fertilidad, deben integrarse a los exámenes de rutina empleados en el laboratorio, para lo cual sería útil el desarrollo de kits de fácil uso para la detección de estos. Los análisis proteómicos unidos a otras pruebas que determinen el estado del DNA, de la mitocondria y del estado acrosomal, además de las de motilidad, viabilidad y morfología espermática, han propuesto que la capacidad fecundante de

una muestra seminal es de carácter multifactorial, por lo cual es difícil de ser explicado o identificado por una sola prueba o por un solo biomarcador. Lo anterior plantea la posibilidad de desarrollar modelos matemáticos que involucren todos estos factores para lograr aproximarse a un diagnóstico claro y temprano de fertilidad en machos bovinos.

Finalmente, las proteínas relacionadas con aspectos de protección o del funcionamiento espermático, y por su posible uso como aditivos en medios de criopreservación o de fertilización in vitro, deben aislarse, separarse y purificarse y producirse de manera eficiente para realizar los correspondientes estudios biológicos tendientes a comprobar y validar su papel en el proceso reproductivo.

## Conflicto de intereses

Los autores firmantes del presente artículo de revisión declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

## Contribuciones de los autores

Escritura del artículo: AC; Edición del artículo: AC, JC, FR; Supervisión del artículo: JC, FR.

## REFERENCES

- Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *BioEssays*. 1994;16(4):259–67.
- Aitken RJ, Nixon B. Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod*. 2013;19(12):785–93.
- Alvarez-Gallardo H, Kjelland ME, Moreno JF, Welsh TH, Randel RD, Lammoglia MA, et al. Gamete Therapeutics: Recombinant Protein Adsorption by Sperm for Increasing Fertility via Artificial Insemination. *PLoS One*. 2013;8(6):e65083.
- Alves MBR, Arruda RP de, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VHG, Nogueira VJM, et al. Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. *Theriogenology*. 2021;161:26–40.
- Ardon F, Suarez SS. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction*. 2013;146(2):111–7.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Sikka SC. Antioxidant potential of human serum albumin: Role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. *J Androl*. 1998;19(4):412–9.
- Bailey R, Griswold MD. Clusterin in the male reproductive system: Localization and possible function. *Mol Cell Endocrinol*. 1999;151(1–2):17–23.
- Baldwin MA. Protein Identification by Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(1):1–9.
- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muñoz-Blanco T, et al. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology (Basel)*. 2000;63(5):1531–1537.

- Boe-Hansen GB, Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, et al. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim Reprod Sci.* 2015;162:20–30.
- Brouwers JF, Boerke A, Silva PFN, Garcia-Gil N, van Gestel RA, Helms JB, et al. Mass spectrometric detection of cholesterol oxidation in bovine sperm. *Biol Reprod.* 2011;85(1):128–36.
- Bustamante-Filho IC, Renato Menegassi S, Ribas Pereira G, Dias Salton G, Mosena Munari F, Roberto Schneider M, et al. Bovine seminal plasma osteopontin: Structural modelling, recombinant expression and its relationship with semen quality. *Andrologia.* 2021;53(1):1–15.
- Bustamante-Filho IC, Salton GD, Munari FM, Schneider MR, Mattos RC, Laurino JP, et al. Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. *Anim Reprod.* 2014;11(2):96–103.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod.* 1999;60(2):454–60.
- Chantler E, Abraham-Peskir J V. Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia.* 2004;36(2):87–93.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *J Androl.* 1997;18(4):461–8.
- D'Amours O, Frenette G, Bourassa S, Calvo É, Blondin P, Sullivan R. Proteomic Markers of Functional Sperm Population in Bovines: Comparison of Low- and High-Density Spermatozoa Following Cryopreservation. *J Proteome Res.* 2018;17(1):177–88.
- Danshina P V., Geyer CB, Dai Q, Goulding EH, Willis WD, Kitto GB, et al. Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) is essential for sperm function and male fertility in mice. *Biol Reprod.* 2010;82(1):136–45.
- De Clerck YA, Yean TD, Ratzkin BJ, Lu HS, Langley KE. Purification and characterization of two related but distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1989;264(29):17445–53.
- Desnoyers L, Théarien I, Manjunath P. Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev.* 1994;37(4):425–35.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Töpfer-Petersen E, et al. Immunolocalization and Quantitation of Acidic Seminal Fluid Protein (aSFP) in Ejaculated, Swim-up, and Capacitated Bull Spermatozoa. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994;375(7):457–62.
- Druart X, de Graaf S. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Anim Reprod Sci.* 2018;194:33–40.
- Druart X, Rickard JP, Tsikis G, de Graaf SP. Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology.* 2019;137:30–5.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2003;61(1):103–15.
- Einspanier R, Amselgruber W, Sinowatz F, Henle T, Ropke R, Schams D. Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus*). *J Reprod Fertil.* 1993;98(1):241–4.
- Einspanier R, Krause I, Calvete JJ, Töpfer-Petersen E, Klostermeyer H, Karg H. Bovine seminal plasma ASFP: Localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBS Lett.* 1994;344(1):61–4.
- Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction.* 2007;133(5):909–17.
- Esch FS, Ling NC, Böhlen P, Ying SY, Guillemin R. Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;113(3):861–7.
- Essabbani A, Margottin-Goguet F, Chiocchia G. Identification of clusterin domain involved in NF- $\kappa$ B pathway regulation. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4273–7.
- Fernandes CE, De Souza FF, Souza-Neto JA, Ribola PEM. Heparin-binding proteins of seminal plasma in Nelore bulls. *Cienc Rural.* 2009;39(1):275–8.
- Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2000;1469(3):197–235.
- Garbis S, Lubec G, Fountoulakis M. Limitations of current proteomics technologies. *J Chromatogr A.* 2005;1077(1):1–18.
- Gomes FP, Park R, Viana AG, Fernandez-Costa C, Topper E, Kaya A, et al. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–14.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. 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.* 2007;67(3):468–74.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000;21(6):1037–53.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004;4(12):3665–85.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. *Biol Reprod.* 2006;75(4):501–7.
- Howes EA, Hurst S, Laslop A, Jones R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin,  $\beta$ -chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(7):673–81.
- Hultin-Rosenberg L, Forshed J, Branca RMM, Lehtiö J, Johansson HJ. Defining, comparing, and improving iTRAQ quantification in mass spectrometry proteomics data. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(7):2021–31.
- Ibrahim NM, Troedsson MHT, Foster DN, Loseth KJ, Farris JA, Blaschuk O, et al. Reproductive tract secretions and bull

- spermatozoa contain different clusterin isoforms that cluster cells and inhibit complement-induced cytolysis. *J Androl.* 1999;20(2):230–40.
- Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. *Rev Bras Reprodução Anim.* 2009;(Supl. 6):25–31.
  - Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Mattos RC. Proteínas de baixo peso molecular do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. *Acta Sci Vet.* 2003;31(1):21.
  - Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology.* 2004;61(2–3):255–66.
  - Jois PS, Plante G, Thérien I, Manjunath P. Functional characterization of the domains of the bovine binder of Sperm 5 (BSP5) protein. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015;13(1):1–11.
  - Jones SE, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(5):427–31.
  - Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. Sperm and seminal plasma proteomics of high-versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology.* 2019;126:41–8.
  - Kelly VC, Kuy S, Palmer DJ, Xu Z, Davis SR, Cooper GJ. Characterization of bovine seminal plasma by proteomics. *Proteomics.* 2006;6(21):5826–33.
  - Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int J Vet Sci Med.* 2018;6:S49–56.
  - Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 1993;49(6):1202–7.
  - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
  - Liu Q, Xie QZ, Zhou Y, Yang J. Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote.* 2014;23(04):622–630.
  - Longin J, Guillaumot P, Chauvin MA, Morera AM, Le Magueresse-Battistoni B. MT1-MMP in rat testicular development and the control of sertoli cell proMMP-2 activation. *J Cell Sci.* 2001;114(11):2125–34.
  - Magalhães MJ, Martins LF, Senra RL, Santos TF dos, Okano DS, Pereira PRG, et al. Differential abundances of four forms of Binder of Sperm 1 in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology.* 2016;86(3):766–777.e2.
  - Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan J, Wright MW. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod.* 2009;80(3):394–7.
  - Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-I binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem.* 1989;264(28):16853–7.
  - Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod.* 2002;67(4):1250–8.
  - Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui REH, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:13–38.
  - McCauley TC, Zhang HM, Bellin ME, Ax RL. Identification of a heparin-binding protein in bovine seminal fluid as tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Mol Reprod Dev.* 2001;58(3):336–41.
  - Memili E, Moura AA, Kaya A. Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. *Anim Reprod Sci.* 2020;220:106355.
  - Menezes EB, de Oliveira R V., van Tilburg MF, Barbosa EA, Nascimento N V., Velho ALMCS, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from locally-adapted “Curraleiro Pé-Duro bulls” (*Bos taurus*): identifying biomarkers involved in sperm physiology in endangered animals for conservation of biodiversity. *Anim Reprod Sci [Internet].* 2017;183:86–101.
  - Menezes ESB, Badial PR, El Debaky H, Husna AU, Ugur MR, Kaya A, et al. Sperm miR-15a and miR-29b are associated with bull fertility. *Andrologia.* 2020;52(1):1–11.
  - Mishra C, Palai TK, Sarangi LN, Prusty BR, Maharana BR. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. *Vet World.* 2013;6(11):905–10.
  - Mitulović G, Mechtler K. HPLC techniques for proteomics analysis - A short overview of latest developments. *Briefings Funct Genomics Proteomics.* 2006;5(4):249–60.
  - Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Anim Reprod Sci.* 2007;98(3–4):169–88.
  - Moura AA, Koc H, Chapman DA, Killian GJ. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: A proteomic approach. *J Androl.* 2006;27(2):201–11.
  - Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562–73.
  - Nauc V, Manjunath P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biol Reprod.* 2000;63(4):1058–66.
  - Pardede BP, Agil M, Supriatna I. Protamine and other proteins in sperm and seminal plasma as molecular markers of bull fertility. *Vet World.* 2020;13(3):556–62.
  - Pereira GR, de Lazari FL, Dalberto PF, Bizarro CV, Sontag ER, Koetz Junior C, et al. Effect of scrotal insulation on sperm quality and seminal plasma proteome of Brangus bulls. *Theriogenology.* 2020;144:194–203.
  - Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction.* 2007;134(1):3–17.
  - Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21(4):525–37.

- Prince CW. Secondary structure predictions for rat osteopontin. *Connect Tissue Res.* 1989;21(1-4):15-20.
- Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, et al. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim Reprod Sci.* 2014;148(1-2):1-17.
- Reyes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard MA. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol Reprod.* 2002;66(1):159-66.
- Romero A, Romao MJ, Varela PF, Kölln I, Dias JM, Carvalho AL, et al. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol.* 1997;4(10):783-8.
- Roncoletta M, Franceschini PH, Lima VFMH de, Rodrigues LH, Oliveira MA, Silva C da. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. *Brazilian J Vet Res Anim Sci.* 1999;36(2):82-86.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(12):1154-69.
- Rueda F, Garcés G, Herrera H, Arbeláez L, Peña M, Velásquez H, et al. Las proteínas del plasma seminal incrementan la viabilidad espermática post-descongelación del semen de toros sanmartinero. *Rev MVZ Cordoba.* 2013;18(1):3327-35.
- Sarsaifi K, Haron AW, Vejayan J, Yusoff R, Hani H, Omar MA, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology.* 2015;84(6):956-68.
- Schoenfelder M, Einspanier R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. *Biol Reprod.* 2003;69(1):269-77.
- Schoneck C, Braum J, Einspanier R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology.* 1995;45(95):633-42.
- Shojaei Saadi HA, van Riemsdijk E, Dance AL, Rajamanickam GD, Kastelic JP, Thundathil JC. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. *J Proteomics.* 2013;82:64-80.
- Singh BP, Asthana A, Basu A, Tangirala R, Mohan Rao C, Swamy MJ. Conserved core tryptophans of Fnl1 domains are crucial for the membranolytic and chaperone-like activities of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS Lett.* 2020;594(3):509-18.
- Singleton CL, Killian GJ. A Study of Phospholipase in Albumin and its Role in Inducing the Acrosome Reaction of Guinea Pig Spermatozoa in Vitro. *J Androl.* 1983;4(2):150-6.
- Souza CEA, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. 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. *Anim Reprod Sci.* 2008;105(1-2):72-89.
- Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Anim Reprod Sci [Internet].* 2013;138(1-2):1-13.
- Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Jerome A, Das GK, Mehrotra S. Sequestration of PDC-109 protein by specific antibodies and egg yolk cryoprotects bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2013;48(5):724-31.
- Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklińska M. Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol.* 2005;5(3):279-90.
- Tedeschi G, Oungre E, Mortarino M, Negri A, Maffeo G, Ronchi S. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem.* 2000;267(20):6175-9.
- Thérien I, Bergeron A, Bousquet D, Manjunath P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(1):97-106.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* 1999;61(3):590-8.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci.* 2005;89(1-4 SPEC. ISS.):159-70.
- Unwin RD. Quantification of proteins by iTRAQ. In: Cutillas PR, Timms JF, editors. *LC-MS/MS in Proteomics Methods and Applications.* Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 205-15.
- Viana AGA, Martins AMA, Pontes AH, Fontes W, Castro MS, Ricart CAO, et al. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-14.
- Visconti PE, Kopf GS. Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *Biol Reprod.* 1998;59(1):1-6.
- Wah DA, Fernández-Tornero C, Sanz L, Romero A, Calvete JJ. Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure.* 2002;10(4):505-14.
- Wasinger VC, Corthals GL. Proteomic tools for biomedicine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;771(1-2):33-48.
- Wempe F, Einspanier R, Scheit KH. Materials and Methods The detection of the bioactive protein aSFP by immunological methods in the secretion of. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;183(1):232-7.
- Westfalewicz B, Dietrich MA, Mostek A, Partyka A, Bielas W, Nizański W, et al. Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. *J Dairy Sci.* 2017;100(3):2282-98.
- Willforss J, Morrell JM, Resjö S, Hallap T, Padrik P, Siino V, et al. Stable bull fertility protein markers in seminal plasma. *J Proteomics.* 2021;236:104135.
- Wittig I, Schägger H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics.* 2008;8(19):3974-90.

- Zalazar L, Ledesma A, Hozbor F, Cesari A. Heterologous recombinant protein with decapacitating activity prevents and reverts cryodamage in ram sperm: An emerging biotechnological tool for cryobiology. *Anim Reprod Sci.* 2016;164:31–9.