

## EXPRESIÓN HETEROLOGA DE LA ESPERMADHESINA-1 BOVINA MEDIANTE *Escherichia coli* COMO BIOFÁBRICA

### Heterologous expression of bovine spermadhesin-1 using *escherichia coli* as biofactory

Jesús Polo Olivella<sup>1</sup> , Angela Brijaldo Villamizar<sup>2</sup> , María Londoño<sup>1</sup> , Diego Velasco Acosta<sup>1</sup> , Jaime Cardozo Cerquera<sup>1</sup> , Fabian Rueda Alfonso<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

<sup>2</sup> Universidad de Pamplona. Laboratorio del Grupo de Investigación en Química. Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

\*Corresponding author:  
Fabian Rueda Alfonso. Email:  
frueda@agrosavia.co

Recibido: 21/06/2022

Aceptado: 23/07/2022

Publicado: 31/07/2022

#### ABSTRACT

Seminal plasma proteins (SPP) are fundamental for oocyte fertilization by sperm cells. In bovine, the structure and function of SPP have been widely described in several studies, where the spermadhesin family has been highlighted. Spermadhesin proteins are closely related to sperm motility and viability along with protecting the sperm cells against oxidative stress. Spermadhesin-1, also known as acidic Seminal Fluid Proteins (aSFP), exhibits a redox activity that protects the sperm cells from reactive oxygen species (ROS), an important feature that could be taken in advantage to improve the post-thaw seminal quality of sperm cells after cryopreservation processes. Therefore, the aim of this research was to produce heterologous aSFP using *Escherichia coli* as a cell factory. For this purpose, the DNA sequence of aSFP was inserted into a pDAss plasmid, containing a six-histidine tag (6xhis). The obtained construct was used to transform BL21 (DE3) *E. coli* competent cells. The expression trials were developed at three different temperatures (37°, 25°, and 16°C) and two different concentrations of Isopropyl-β-D-1-thiogalactopiranoside (IPTG) as the expression inductor (0.5 y 1.0 mM). The aSFP-H6 produced was purified by affinity chromatography, and the peptide sequence was verified through mass spectrometry. Results evidenced the best conditions for the recombinant aSFP-H6 production (16°C and 1.0 mM of IPTG). In this sense, the viability and the conditions to produce heterologous bovine aSFP were described and could be further used to enhance cryopreservation bovine sperm mediums.

**Keywords:** Seminal plasma, bovine reproduction, recombinant proteins, sperm cryopreservation, reproductive biotechnology

#### RESUMEN

Las proteínas del plasma seminal (PPS) son fundamentales para que el espermatozoide logre la fecundación del ovocito. En los bovinos, las estructura y funciones de las PPS han sido descritas en varios trabajos que destacan a las Espermadhesinas. Estas proteínas influyen en la motilidad y la protección del espermatozoide contra el estrés oxidativo. Dentro de las espermadhesinas, se destaca la aSFP (acidic Seminal Plasma Protein), también conocida como Espermadhesina-1. Se ha descrito que la aSFP presenta una actividad redox que protege al espermatozoide contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), característica que puede ser aprovechada para mejorar la calidad seminal luego de la criopreservación. El objetivo de este trabajo fue producir aSFP recombinante mediante el uso de *Escherichia coli* como fábrica celular y establecer las mejores condiciones para su producción. Para esto, la secuencia genética de la aSFP fue clonada en un plásmido pDAss con una cola de seis histidinas (6xhis). El constructo obtenido se usó para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (DE3). Se realizaron pruebas de expresión a tres temperaturas (37°, 25° y 16°C) y dos concentraciones (0.5 y 1.0 mM) de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor. La aSFP-H6 expresada se purificó mediante cromatografía de afinidad y su secuencia fue comprobada por espectrometría de masas (MS). Los resultados evidenciaron que la proteína se expresó de forma soluble en mayor cantidad a 16°C y 1.0 mM de IPTG. De esta manera, la viabilidad de producir aSFP heteróloga fue descrita y podría usarse para optimizar medios de criopreservación de semen bovino.

**Palabras clave:** Plasma seminal, reproducción bovina, proteínas recombinantes, criopreservación espermática, biotecnología reproductiva.

## INTRODUCTION

Los estudios acerca de las proteínas del plasma seminal (PPS) bovino han permitido adquirir información relevante sobre la relación entre los perfiles proteómicos y los parámetros de calidad seminal, índices de fertilidad y la congelabilidad del semen bovino (Kumar et al., 2012; Manjunath & Thérien, 2002; Muhammad Aslam et al., 2014). En estas investigaciones, se destaca la búsqueda de marcadores proteicos de fertilidad y congelación del semen en el plasma seminal y fluidos de las glándulas sexuales sexuales (Eduardo et al., 2008; Mortarino et al., 1998) dentro de los cuales, algunos se han enfocado en la proteína ácida del fluido seminal (aSFP), también conocida como Espermadhesina-1. La aSFP es un polipéptido no glicosilado de 13 kDa que se sintetiza en la vesícula seminal. Tiene 114 aminoácidos dentro de los cuales se forman dos enlaces disulfuro intramoleculares ubicados entre cuatro residuos de cisteínas adyacentes (Einspanier et al., 1994). Su importancia se debe principalmente a su participación en la regulación de la motilidad, su relación con la actividad mitocondrial (Roncoletta et al., 2006) y su potencial antioxidante debido a la protección que ejerce en los espermatozoides contra los radicales libres de oxígeno, actividad atribuida principalmente a su estructura, en la cual al menos uno de los dos puentes disulfuro que forma, está activo durante la función de las reacciones redox y en el potencial antioxidante (Schoneck et al., 1995). Se ha encontrado que la aSFP puede reducir la peroxidación lipídica, lo que protege a la membrana plasmática de los espermatozoides de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tedeschi et al., 2000).

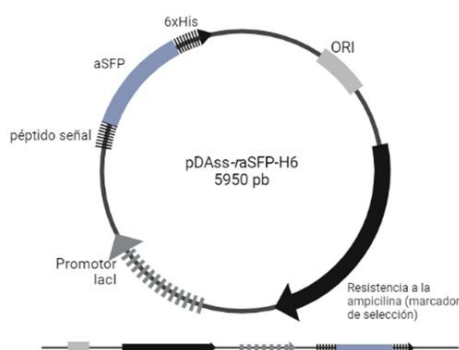
Por su parte, diversas investigaciones han evidenciado los efectos positivos de la adición de proteínas de plasma seminal en semen de ovinos (Barrios et al., 2000; Cardozo et al., 2009) y bovinos (Rueda et al., 2013). Se ha descrito que la adición de aSFP a semen bovino en condiciones in vitro, evidencia una reducción en la peroxidación lipídica y un aumento en la actividad mitocondrial (Schoneck et al., 1995). Esto último se ha comprobado por el patrón de distribución topográfica de aSFP en la célula espermática, con tendencia a unirse a la porción intermedia del espermatozoide, donde se encuentran las mitocondrias (Bustamante-Filho et al., 2014). En este sentido, estudios recientes se han enfocado hacia la producción PPS producidas de forma recombinante no solo para el estudio de su estructura y función sino con el fin de desarrollar elementos adicionales que puedan mejorar técnicas de biotecnología reproductiva como la criopreservación de semen, fertilización in vitro e incluso producción de embriones en condiciones de laboratorio. Al respecto, se ha descrito que las proteínas heterólogas tienen el potencial de proteger, prevenir o disminuir los efectos deletéreos que provoca la criopreservación (Zalazar et al., 2016). Estudios alrededor de proteínas como las BSPs (Binder Sperm proteins) han reportado con éxito la producción de BSP-A2, la cual forma una importante cantidad de agregados por la presencia de múltiples puentes disulfuro (Singh et al., 2020). Recientemente, se ha reportado la expresión de Osteopontina recombinante clonada a partir de DNA extraído de la glándula vesicular bovina; al respecto se ha destacado una expresión exitosa pero no hay resultados concluyentes sobre su potencial sobre procesos de criopreservación o fertilización in vitro (Bustamante-Filho et al., 2021). En este sentido, evaluar la viabilidad y las condiciones necesarias para producir aSFP

recombinante, como alternativa para el desarrollo de aditivos biológicos capaces de aumentar la eficiencia reproductiva del semen criopreservado. Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones para expresar aSFP de forma heteróloga usando *Escherichia coli* como fábrica celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Gen de la aSFP, plásmido y cepas de *E. Coli*

La producción de la proteína aSFP bovina recombinante se realizó a partir de la secuencia del DNAC reportado en la base de datos NCBI prot (número de accesión: NM-174616). Se usó la síntesis comercial del Gen (UniProtKB - P29392) el cual se optimizó para el uso del codon de *Escherichia coli*. El gen optimizado se insertó en un plásmido pDAss (figura 1) con resistencia a ampicilina, una señal de translocación hacia el periplasma con el fin de favorecer la formación de los puentes disulfuro, y el promotor lacI inducible por IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). El constructo resultante (pDAss-aSFP-H6) fue usado para transformar células competentes de la cepa de *E. coli* BL21(DE3).



**Figura 1.** Constructo plasmídico obtenido al clonar la secuencia genética de la aSFP bovina (NM-174616), optimizada para el uso de codón de *Escherichia coli*, en un plásmido pDAss que contiene un péptido señal para translocar la proteína producida a la zona periplasmática de las bacterias. A la secuencia de la aSFP se adicionó una cola de histidinas (6x His) en la parte N-terminal para favorecer la purificación.

**Preparación de células competentes y transformación de *E. coli***  
Se prepararon células competentes de *E. coli* BL21(DE3) a partir de un cultivo de 50 mL realizado de un inóculo 1/100 en crecimiento a 37 °C y 200 rpm. Una vez los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD<sub>550</sub>) entre 0.2-0.4, se centrifugaron a 4000xg, 15min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 12.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM para ser incubados en baño de hielo por 45min. Las células resuspendidas se centrifugaron de nuevo bajo las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 1.25 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM con glicerol al 15 % v/v. Se prepararon alícuotas de 200µL que se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su posterior uso.

### Transformación de *E. coli* BL21(DE3)

Para la transformación de las células competentes de *E. coli* BL21(DE3), se usaron 200 ng del constructo pDAss-aSFP-H6 que fueron adicionados a una alícuota de 200µL de las

bacterias competentes descongeladas. La mezcla de bacterias y plásmido se incubó durante 1 hora en baño de hielo y luego se llevó a 42 °C durante 45 seg. La mezcla se llevó de nuevo a baño de hielo por 1 min, y se adicionaron 800 µL de medio Luria Bertani estéril (LB, Thermo Fisher, Illinois USA). El cultivo se dejó crecer a 37 °C durante 1 h y se llevó a una placa de LB con ampicilina 100 µg/mL (Merck, Darmstadt, Alemania). La placa se incubó a 37 °C durante 16 h, se seleccionaron las colonias resultantes para generar un nuevo cultivo y extraer el ADN plasmídico para comprobar la transformación mediante digestión por enzimas de restricción. Las colonias positivas se almacenaron en crioperlas glicerizadas a 80°C hasta su posterior uso.

### Cultivos y pruebas de expresión

Se realizaron pruebas de expresión a tres temperaturas (16, 25 y 37 °C) y dos diferentes concentraciones de IPTG como inductor (0.5 y 1.0 mM) para determinar las mejores condiciones de expresión. Las pruebas se realizaron con la activación de la cepa de BL21 (DE3) transformada, donde se adicionó 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) por cada crioperla. La mezcla se dejó crecer a 37 °C, 250 rpm por 16 h a las cuales se le midió el crecimiento (OD500). A partir del inocular, se establecieron nuevos cultivos con una OD500 inicial de 0.1 en 50 mL de LB-ampicilina. Estos fueron incubados durante tres horas a 37 °C, 250 rpm, previa inducción con IPTG (1 mM o 0.5 mM). Los cultivos se dividieron para la evaluación del efecto de la temperatura. Una vez realizados los cultivos, se centrifugaron 4500xg durante 10 min a 4°C y los pellets se resuspendieron en 1 mL de PBS con la adición de un coctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Se extrajo el contenido extracelular de los pellets mediante disrupción celular usando un sonicador (Omni Sonic Ruptor 400 150 Ultrasonic Homogenizer, Kennesaw, USA) a potencia del 20% en ciclos "on/off" de 0.5 seg durante 5 min. Se realizaron 3 rondas de ultrasonido por cada pellet. Sobrenadantes y pellets se separaron para evaluar las fracciones solubles e insolubles o (cuerpos de inclusión) de la aSFP-H6 producida.

### SDS-PAGE y Western blot

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) para analizar las fracciones obtenidas, cargando 15 µL de muestra (3/4 muestra y 1/4 tampón de carga) de acuerdo con el método de Laemmli 17 a 100 V por 1.5 h. Se llevó a cabo el western-blot transfiriendo el gel SDS-PAGE a una membrana de PVDF, usando solución de bloqueo de membrana, anticuerpo primario anti HIS (Santa Cruz Technology, California, USA) dilución 1:2000, 2 horas, y como anticuerpo secundario anti-Mouse (Bio-Rad) dilución 1:2000, 2 horas. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia (Super signal West Pico, Thermo Fisher, Illinois, USA) en el equipo ChemiDoc Touch y las imágenes fueron analizadas por el software Quantity One de Bio-Rad (Hercules, CA., USA).

### Cromatografía de afinidad

Se aplicó el proceso de purificación por afinidad a la cola de histidinas (óxis) a la fracción soluble del pellet celular, utilizando una columna His-Trap HP (GE healthcare, Piscataway, NJ, USA) de 1 mL funcionalizada con níquel usando gradientes de imidazol. La elución se realizó en un gradiente lineal, usando 20 volúmenes de la columna, utilizando el sistema FPLC AKTA pure. Las fracciones obtenidas fueron analizadas con SDS-PAGE 12% y transferidas a una membrana PVDF para la detección por western blot de

acuerdo con la metodología descrita en el apartado anterior. Teniendo en cuenta los resultados de la separación cromatográfica, se unieron las fracciones y se dializaron en un tampón de diálisis NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 4.5, a 4 °C en tres pasos, 1 L de tampón por 1 h, 2 L durante 16 h y finalmente 1L por 1 h. La muestra dializada se centrifugó a 15.000 g por 15 min para separar el precipitado. La cuantificación del total de proteína se hizo mediante el método de Bradford 18. Finalmente se realizó un gel SDS-PAGE al 12 % para analizar la muestra obtenida de la diálisis, y la identidad de la banda obtenida se confirmó mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

### Espectrometría de masas

Para el análisis de la proteína purificada por espectrometría de masas, la muestra purificada se diluyó 1:2 en H<sub>2</sub>O ultrapura se dializó en una solución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM durante 1.5 h. Después de la diálisis, la proteína diluida se mezcló con una matriz de 2,6- dihidroxiacetofenona (1:1) y se depositó en una placa metálica. La muestra se analizó usando un método lineal en un UltrafleXtreme MALDI-TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) con aceleración de iones de 25 kV. Los espectros obtenidos se contrastaron con las bases de datos MASCOT y Swiss-prot.

### Análisis estadístico

El crecimiento de los cultivos BL21(DE3)- pDAss-aSFP-H6, medido por la OD se analizó mediante un análisis de varianza comparando por un lado los tratamientos de temperatura y por el otro las concentraciones de IPTG. Todos los análisis se realizaron a través del programa estadístico "R".

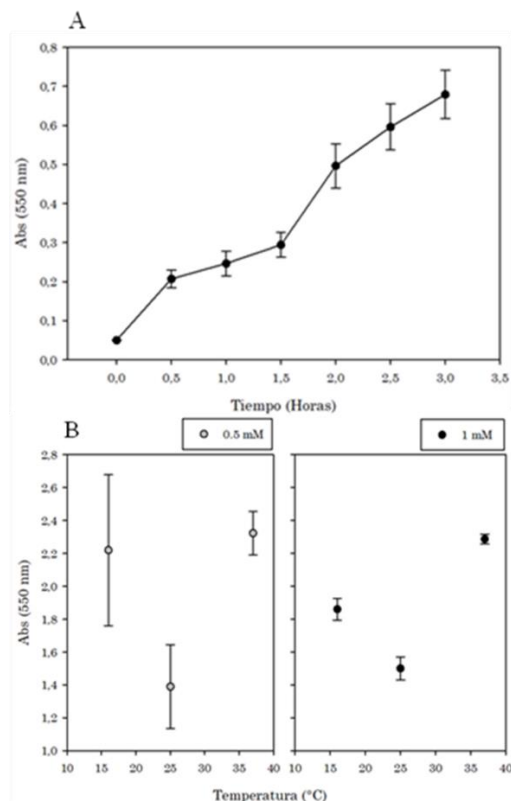
## RESULTADOS

Las pruebas de crecimiento de BL21(DE3) transformada con pDAss-aSFP-H6 evidenciaron que la fase exponencial de crecimiento se presentó a las 2.5 horas, momento en el que se realizó la inducción para las pruebas de expresión (figura 2A). Teniendo en cuenta el crecimiento bacteriano, se evidenció que no existen diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de IPTG evaluadas ( $p = 0.774$ ). Sin embargo, se determinó que independiente de la concentración de IPTG, el crecimiento a 25°C disminuyó respecto a las demás temperaturas (37°C y 16 °C). Por su parte, el mejor crecimiento bacteriano se encontró a 37°C (figura 2B).

De otro lado, al analizar el lisado celular por SDS-PAGE se observan bandas alrededor de los 13 kDa, peso molecular que corresponde a la aSFP-H6. Lo anterior se corroboró con la detección de bandas específicas por Western blot mediante revelado con anti-His. De forma cualitativa se logró observar una mejor expresión de aSFP-H6 en la fase soluble obtenida del cultivo a 16 °C, cuando se usó 1 mM de IPTG (figura 3). De igual forma, se logra observar una buena expresión de la proteína de interés en la fracción insoluble del cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de expresión, se realizaron pruebas con volúmenes mayores de cultivo (1.0 L) para hacer la producción de la aSFP (incubación a 16 °C durante 16 h, con inducción a 1 mM de IPTG). La purificación de la aSFP-H6 mediante cromatografía de afinidad evidenció dos picos: el primero más intenso de proteínas inespecíficas con unión al níquel que se mantiene hasta los 10 mM de imidazol y un segundo pico colectado en las fracciones 14-28 a razón de

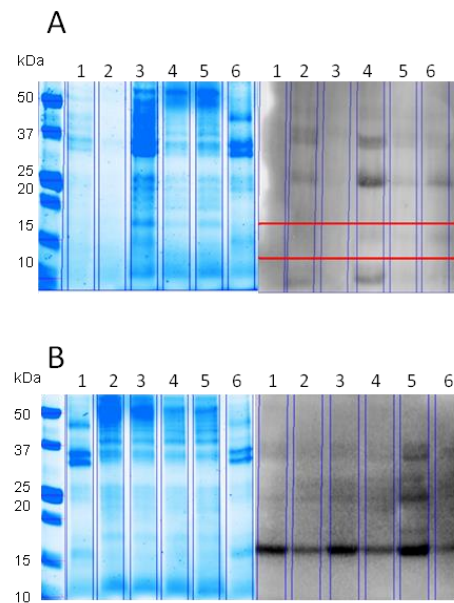
1.0 mL/min. En estas fracciones colectadas se logró detectar una banda mediante el anticuerpo anti His (figura 4) que por peso es compatible con la proteína de interés aSFP-H6. Se determinó que la concentración de proteína en las fracciones luego de la purificación fue de 60 mg por cada litro de cultivo de *E. coli* BL21(DE3) transformada, a las condiciones de producción mencionadas anteriormente en escala de laboratorio. La proteína purificada se identificó mediante espectrometría de masas como Espermadhesina-1 o aSFP con un porcentaje de homología superior al 87 % y una correspondencia en la secuencia del 44% (figura 5).



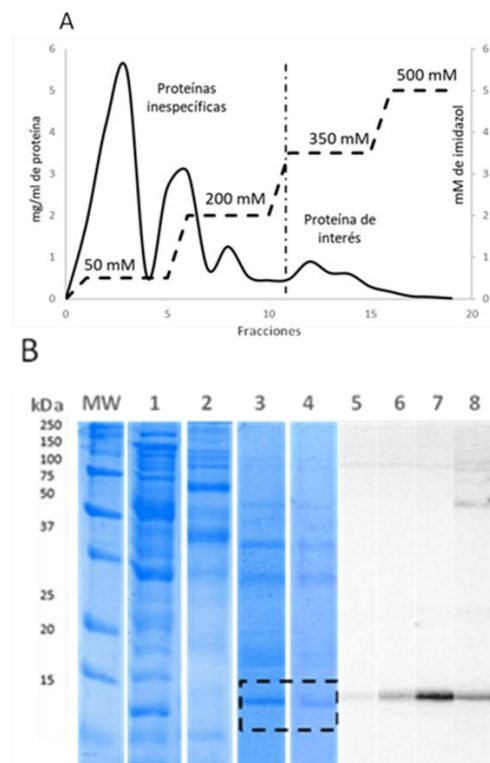
**Figura 2.** Crecimiento bacteriano de la cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido pDAss-aSFP-H6. (A) Cinética de crecimiento para determinar la fase exponencial a la cual se realizó la inducción de la producción; y (B) pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas de producción y diferentes concentraciones del inductor IPTG.

## DISCUSIÓN

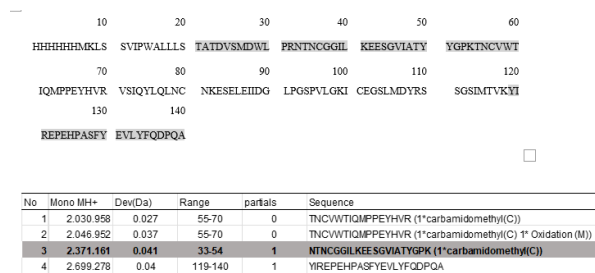
Las espermadhesinas son un grupo de polipéptidos multifuncionales de entre 12 a 16 kDa (Topfer-Petersen et al., 1998), detectadas en plasma seminal de bovinos (Tedeschi et al., 2000), porcinos (Romão et al., 1997), equinos (Reinert et al., 1996) y ovinos (Bergeron et al., 2005). Se cree que participan en diferentes aspectos de la fecundación (Dostàlovà et al., 1994), cumpliendo diversas funciones, como la capacitación de espermatozoides, la estabilización del acrosoma y la fusión entre espermatozoide y ovocito (Haase et al., 2005), así como diferentes capacidades de recubrimiento de espermatozoides y ligandos, y su patrón específico de actividades biológicas, ligadas y moduladas por las variaciones en la secuencia, la glucosilación y el estado de agregación (Bustamante-Filho et al., 2014).



**Figura 3.** SDS-PAGE y Western blot de las pruebas de producción a diferentes temperaturas. (A): 0.5 mM de IPTG; y (B) 1.0 mM de IPTG. Línea 1: Fracción soluble a 37 °C; línea 2: fracción insoluble a 37 °C; línea 3: fracción soluble a 25 °C; línea 4: fracción insoluble a 25 °C; línea 5: fracción soluble a 16 °C; y línea 6: fracción insoluble a 16 °C



**Figura 4.** Purificación de aSFP-H6 mediante columnas de afinidad. (A) Perfil de elución de los lisados intracelulares a diferentes concentraciones de imidazol, la proteína de interés eluyó a 350 mM; y (B) SDS-PAGE (líneas 1-4) y Western Blot (líneas 5-8) revelado con anti-His. Líneas 1 y 5: Fracción soluble completa; líneas 2 y 6: elución con 50 mM de imidazol; líneas 3 y 7: elución con 350 mM de imidazol; y líneas 4 y 8: elución con 500 mM de imidazol.



**Figura 5.** Secuencia peptídica identificada por espectrometría de masas. Los porcentajes de homología superaron 87 % con correspondencia de alrededor de 44 %. En gris los péptidos que coinciden con la secuencia

En el presente trabajo se logró expresar de forma satisfactoria la proteína aSFP, también llamada Espermadhesina-1 en *E. coli* BL21 mediante el vector pDass. La detección con el Anti-His tag y posterior identificación validó la presencia de aSFP-H6 con un peso molecular que concuerda con el peso molecular teórico para la aSFP. Se seleccionaron como condiciones óptimas de cultivo la incubación "overnight" a 16°C e inducción con IPTG 1.0 mM. Estudios previos han demostrado que una espermadhesina porcina (similitudes entre AWN y aSFP > 60%) se logró expresar de forma satisfactoria a 16°C usando IPTG 0.6 mM (Müller et al., 2017), condiciones que concuerdan con los resultados presentados en este estudio. En nuestro trabajo la mejor expresión se logró utilizando IPTG 1 mM, obteniendo la proteína tanto en la fracción insoluble como soluble siendo mayor la fracción insoluble. Esta concentración se encuentra en el rango planteado por algunos autores para la expresión de otras espermadhesinas (Bustamante-Filho et al., 2014; Cajazeiras et al., 2009; Müller et al., 2017), y garantizó un crecimiento celular menos variable, en comparación con 0.5 mM, aunque estadísticamente no presentaron diferencias apreciables. Lo anterior es de importancia en la producción de proteínas recombinantes puesto que se ha descrito que concentraciones altas de IPTG pueden presionar demasiado la maquinaria celular de síntesis proteica y dar lugar no solo a un incremento dramático en la cantidad de proteína mal plegada (cuerpos de inclusión) sino además puede limitar la generación de biomasa, afectando la producción (Carbonell & Villaverde, 2002). Al respecto, se ha descrito que la formación de los cuerpos de inclusión se relaciona de forma estrecha con un desequilibrio entre la agregación de proteínas in vivo, la solubilización y la presencia limitada de chaperonas en situaciones de excesiva expresión heteróloga (Corchero et al., 1996). Adicional a lo anterior, existe una respuesta al estrés causado por la alta velocidad de expresión (Cajazeiras et al., 2009). En un reporte previo de la producción heteróloga de aSFP (Bustamante-Filho et al., 2014) se destacó la alta obtención de esta proteína como material insoluble, con incubación a 37°C con IPTG 0.5 mM por 3 h. Bajo estas mismas condiciones de cultivo, y con las dos concentraciones de IPTG (0.5 y 1 mM) utilizadas en nuestro trabajo, se obtuvo mayor cantidad de proteína en forma soluble, efecto atribuible a la señal de translocación a periplasma que posee el vector pDass, lo que podría relacionarse con un mejor plegamiento de la proteína gracias al ambiente oxidativo que ahí se encuentra (Marco, 2009). En este sentido, la capacidad de generar los puentes disulfuro, puede aumentar la actividad biológica en la proteína heteróloga, por lo que la señal de translocación a periplasma

es un avance importante en la producción de este tipo de proteínas, dado que *E. coli* es incapaz de generar modificaciones post-traduccionales por la ausencia de chaperonas específicas que promuevan la conformación correcta de la proteína (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Por su parte, bajo las condiciones óptimas descritas en este trabajo, se logró purificar y recuperar alrededor de 60 mg de aSFP-H6 por cada litro de cultivo de *E. coli* BL21(DE3). Al respecto, se han reportado cantidades semejantes bajo condiciones similares de producción y purificación en la misma fábrica celular (Sivashanmugam et al., 2009). Estos resultados merecen un análisis más profundo de cara al escalamiento para aumentar la cantidad de aSFP-H6 en biorreactores en los que se pueda realizar un control más adecuado del pH de los medios y condiciones de crecimiento.

De esta manera, este trabajo representa un nuevo planteamiento para la producción de aSFP recombinante, un avance que permitirá a futuro estudiar completamente la estructura y la actividad biológica de la proteína. La proteína aSFP supone una gran opción a futuro para el desarrollo de aditivos o suplementos que puedan mejorar los procedimientos de conservación debido a su relación positiva con la congelabilidad (Jobim et al., 2004) y a su capacidad (dosis-dependiente) de mantener la viabilidad y la motilidad espermática en procesos de criopreservación de semen (Bustamante-Filho et al., 2014; Romão et al., 1997). Por último, la obtención de una mayor cantidad de proteína soluble traería como ventaja la eliminación de procedimientos de replegamiento, procesos que se realizan para solubilizar proteínas recombinantes que han sido producidas en su mayoría en forma de cuerpos de inclusión. La eliminación de dichos procedimientos podría disminuir los costos de producción en caso de que la adición de aSFP-H6 logre prevenir o revertir los efectos deletéreos ocasionados por el estrés oxidativo que se genera en los procesos de criopreservación.

## CONCLUSIONES

El estudio de las proteínas del plasma seminal bovino permanece como un tema relevante para el desarrollo y optimización de procesos en biotecnología reproductiva. En este trabajo se logró la expresión y purificación de aSFP bovina en el sistema bacteriano *E. coli* BL21(DE3) de forma satisfactoria y se establecieron las mejores condiciones en laboratorio bajo un sistema específico que permitió obtener gran parte de la proteína recombinante de manera soluble. Esto no solo representa una interesante ventaja en términos de producción y purificación de proteínas, sino que abre las puertas para un estudio más detallado de su estructura y función en la regulación de los procesos espermáticos. Adicionalmente, es relevante entender el efecto de la aSFP bovina sobre la criopreservación, lo que constituye un importante paso hacia el desarrollo de aditivos que puedan mitigar el efecto deletéreo de la criopreservación en las células espermáticas y, en consecuencia, aumentar la eficiencia de herramientas biotecnológicas de uso frecuente en la reproducción bovina. Por lo tanto, evaluar el efecto de incluir esta y otras proteínas producidas de forma recombinantes, en procesos como la criopreservación de semen, la fertilización in vitro y la producción de embriones in vitro es de gran importancia.



### Conflicto de intereses

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

### Contribuciones de los autores

Desarrollo experimental: JP, AB; Análisis de datos: MCL, DV, FR; Escritura, edición y revisión: MCL, DV, JC, FR; Supervisión del artículo: JC, FR.

### Agradecimientos

Este trabajo hizo parte del proyecto titulado: Soluciones biotecnológicas para mejorar el desempeño reproductivo de los bovinos en procesos in vivo e in vitro. Financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR en Agenda interna de investigación de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA (vigencia TV18).

### REFERENCES

- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, et al. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.* 2000;63(5):1531-1537. doi:10.1095/biolreprod63.5.1531
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C, Manjunath P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(4):461-470. doi:10.1002/mrd.20310
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Bustamante-Filho I, Salton GD, Munari FM, et al. Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. *Anim Reprod.* 2014;11(2):96-103.
- Bustamante-Filho IC, Renato Menegassi S, Ribas Pereira G, et al. Bovine seminal plasma osteopontin: Structural modelling, recombinant expression and its relationship with semen quality. *Andrologia.* 2021;53(1):1-15. doi:10.1111/and.13905
- Cajazeiras JB, Melo LM, Albuquerque ES, Rádis-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJF. Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. *Genet Mol Res.* 2009;8(3):1147-1157. doi:10.4238/vol8-3gmr639
- Carbonell X, Villaverde A. Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion. Published online 2002:1939-1944.
- Cardozo JA, Grasa P, B MTM. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. Published online 2009.
- Corchero JL, Viaplana E, Benito A, Villaverde A. The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of  $\beta$ -galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *J Biotechnol.* 1996;48(3):191-200. doi:10.1016/0168-1656(96)01508-8
- Dostàlovà Z, Calvete JJ, Sanz L, 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):457-461.
- Eduardo C, Souza A, Moura AA, 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;105:72-89. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.027
- 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):61-64. doi:10.1016/0014-5793(94)00362-9
- Haase B, Schlötterer C, Hundrieser ME, et al. Evolution of the spermadhesin gene family. *Gene.* 2005;352(1-2):20-29. doi:10.1016/j.gene.2005.04.015
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002;295(5561):1852-1858. doi:10.1126/science.1068408
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology.* 2004;61(2-3):255-266. doi:10.1016/S0093-691X(03)00230-9
- Kumar P, Kumar D, Singh I, Yadav PS. Seminal Plasma Proteome: Promising Biomarkers for Bull Fertility. *Agric Res.* 2012;1(1):78-86. doi:10.1007/s40003-011-0006-2
- Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 2002;53(1-2):109-119. doi:10.1016/S0165-0378(01)00098-5
- Marco A De. bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. 2009;18. doi:10.1186/1475-2859-8-26
- Mortarino M, Tedesehi G, Negri A, Gottardi L, Maffeo G. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. Published online 1998:797-801.
- Muhammad Aslam MK, Kumaresan A, Sharma VK, et al. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology.* 2014;82(9):1254-1262. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.08.007
- Müller FSK, Krause PME, Braun BC. Recombinant expression of porcine spermadhesin AWN and its phospholipid interaction: Indication for a novel lipid binding property. 2017;(November 2016):1-11. doi:10.1111/rda.12953
- Nature. Laemmli buffer Background Purpose of the Laemmli buffer Laemmli Buffer Recipe Preparation Recommended Storage Temperature of Laemmli buffer Laemmli buffer References. *Nature.* Published online 1970.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Ma K. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. 1996; 640:636-640.

- Romão MJ, Kölln I, Dias JM, et al. Crystal structure of acidic seminal fluid protein (aSFP) at 1.9 Å resolution: A bovine polypeptide of the spermadhesin family. *J Mol Biol.* 1997;274(4):650-660. doi:10.1006/jmbi.1997.1423
- Roncoletta M, Morani EDSC, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci.* 2006;91(1-2):77-87. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.03.014
- Rueda F, Garcés P T, Herrera L R, et al. Seminal plasma proteins increase the post-thaw sperm viability of Sanmartinero bull's semen. *Rev MVZ Cordoba.* 2013;18(1):3327-3335.
- 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):633-642.
- Singh BP, Asthana A, Basu A, Tangirala R. Conserved core tryptophans of Fnll domains are crucial for the membranolytic and chaperone-like activities of bovine seminal plasma protein PDC-109. 2020; 594:509-518. doi:10.1002/1873-3468.13617
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. 2009;18(1):936-948. doi:10.1002/pro.102
- 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):6175-6179. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01698.x
- 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;164:31-39. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.11.007