

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Proteoma diferencial en espermatozoides y plasma seminal de conejo con diferente fertilidad.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA: Dña. María Isabel Aybar Molina

TUTOR: D. José Salvador Vicente Antón

València, 5 de julio de 2021

Título

Proteoma diferencial en espermatozoides y plasma seminal de conejo con diferente fertilidad.

Resumen

En la actualidad parámetros como la motilidad o la morfología son los que se emplean para estimar la fertilidad de las muestras seminales. Sin embargo, estos parámetros seminales convencionales proporcionan una pobre correlación con la fertilidad masculina. El objetivo de este estudio fue evaluar cómo el proteoma del plasma seminal y de los espermatozoides puede influir sobre su capacidad fecundante. En primer lugar, se tomaron muestras de eyaculados de conejos con parámetros similares de motilidad y morfología para el análisis del proteoma seminal y de los espermatozoides. Además, se elaboraron dosis seminales para la inseminación de las conejas y se registró el porcentaje de gestantes y la prolificidad. A partir de estos resultados se clasificaron las dosis seminales utilizadas en dos categorías (alta y baja fertilidad, 80,0% vs 63,9%). Tras analizar los proteomas del plasma seminal y de los espermatozoides (a partir de los que se elaboraron las dosis seminales) de las 643 y 1361 proteínas anotadas en el plasma y en los espermatozoides, 6 y 50 de ellas respectivamente se encontraban diferencialmente expresadas en ambos grupos. La mayoría de estas proteínas presentaban actividades catalíticas o de unión relacionadas con la función de los espermatozoides, pero solo 12 de estas mostraron tras la transformación a \log_2 un $FC \geq 1,2$. De las proteínas destacan como posibles biomarcadores, en primer lugar la Phospholipid-transporting ATPase (sobrexpresada en el grupo de alta fertilidad tanto en el proteoma del plasma seminal y de los espermatozoides) que se encuentra ligada a la estabilización de la membrana y la prevención de la capacitación temprana. La proteína Programmed cell death 6 interacting protein (sobrexpresada en el proteome de los espermatozoides de las muestras de baja fertilidad) y que se asocia a procesos como la reparación de membranas y la apoptosis celular. Y, por último, la proteína G1T3K6 altamente expresada en el grupo de alta fertilidad del proteoma de los espermatozoides, pese a ser la que presenta un mayor FC no se pudo investigar porque sigue sin estar identificadas sus funciones.

Palabras clave

Plasma, espermatozoides, proteoma, fertilidad y conejo.

Alumno/a: Dña. María Isabel Aybar Molina

Tutor: D. José Salvador Vicente Antón

València, 5 de julio de 2021

Title

Differential proteome in spermatozoa and seminal plasma of rabbits with different fertility.

Abstract

Parameters such as motility or morphology are currently used to estimate the fertility of semen samples. However, these conventional seminal parameters provide a poor correlation with male fertility. The aim of this study was to evaluate how the proteome of seminal plasma and spermatozoa may influence their fertility. First, ejaculates from rabbits with similar motility and morphology parameters were sampled for seminal and sperm proteome analysis. In addition, seminal doses were prepared for insemination of the rabbits and the percentage of pregnancies and prolificacy were recorded. Based on these results, the seminal doses used were classified into two categories (high and low fertility, 80.0% vs. 63.9%). After analysing the proteomes of seminal plasma and spermatozoa (from which the seminal doses were elaborated) of the 643 and 1361 proteins annotated in plasma and spermatozoa, 6 and 50 of them respectively were differentially expressed in both groups. Most of these proteins had catalytic or binding activities related to sperm function, but only 12 of these showed after log₂ transformation a FC \geq 1.2. Among the proteins, Phospholipid-transporting ATPase (overexpressed in the high fertility group in both the seminal plasma and sperm proteome), which is linked to membrane stabilisation and prevention of early capacitation, stands out as a possible biomarker. Programmed cell death 6 interacting protein (overexpressed in the proteome of spermatozoa from low-fertility samples), which is associated with processes such as membrane repair and cell apoptosis. Finally, the G1T3K6 protein, highly expressed in the high fertility group of the sperm proteome, despite being the protein with the highest FC, could not be investigated because its functions have not yet been identified.

Key words

Plasma, sperm, proteome, fertility and rabbit.

Alumno/a: Dña. María Isabel Aybar Molina

Tutor: D. José Salvador Vicente Antón

València, 5 de julio de 2021

Dedicatorias y agradecimientos

Después de estos cuatro años me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de este camino. En primer lugar, quería mostrar mi agradecimiento a mi familia y amigos, pero especialmente a mis tres hermanas y a mis compañeras de piso que han estado animándome todos los días y haciéndome ver que era una persona capaz y que podía con esta carrera.

También me gustaría darle las gracias a mi profesor y tutor de TFG José Vicente Antón por haberme ayudado tanto, por su trato siempre amable, por el tiempo que ha dedicado en explicarme todo con detalle y por darme la oportunidad de realizar este trabajo y hacer que me guste aún un poco más la reproducción.

Por último, me gustaría mostrar también mi agradecimiento y cariño a mi tutor de Erasmus prácticas Ismael Rodrigo Bravo, por la gran implicación que tiene con sus alumnos, por ser tan buen profesor y por estar ahí para orientarnos y para echarnos una mano cuando lo hemos necesitado.

Maribel.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Parámetros de calidad seminal y capacidad de predicción de la fertilidad.....	1
1.1.1. Características del eyaculado.....	1
1.1.2. Características de los espermatozoides.....	3
1.1.2.1. Morfoanomalias.....	3
1.1.2.2. Movilidad y parámetros de movilidad.....	4
1.1.2.3. Funcionalidad de las membranas espermáticas.....	5
1.1.2.4. Integridad del ADN.....	6
1.2. Biomarcadores proteicos en la composición del plasma seminal y en los espermatozoides relacionados con la capacidad fecundante.....	7
1.2.1. Composición y función del plasma seminal.....	7
1.2.2. Origen y función de biomarcadores proteicos encontrados en el plasma seminal.....	8
1.2.3. Biomarcadores proteicos en los espermatozoides y su relación con las características espermáticas y su funcionalidad.....	9
2. Objetivos	12
3. Materiales y métodos	14
3.1. Animales.....	14
3.2. Diseño experimental.....	14
3.3. Recolección de semen.....	15
3.4. Evaluación de los eyaculados.....	15
3.4.1. Evaluación inicial de los eyaculados de cada grupo de machos.....	15
3.4.2. Evaluación y elaboración dosis seminales a partir de las mezclas espermáticas de cada grupo de machos.....	15
3.4.2.1. Morfología espermática e integridad acrosómica de las mezclas espermática.....	16
3.4.2.2. Parámetros de motilidad espermática de mezclas espermáticas.....	16
3.4.2.3. Viabilidad y análisis HOST.....	16
3.4.3. Procedimiento de inseminación.....	17
3.5. Muestras de extracción de plasma y proteínas espermáticas.....	17
3.6. Análisis de cuantificación relativa proteómica: Análisis SWATH (DIA) MSMS.....	17
3.6.1. Construcción de bibliotecas espectrales.....	18
3.6.2. Motor de búsqueda ProteinPilot v5.0. (Sciex).....	18

3.6.3. Análisis de las muestras.....	19
3.7. Análisis estadísticos.....	20
4. Resultados y discusión.....	22
4.1. Parámetros espermáticos, fertilidad y prolificidad de las muestras.....	22
4.2. Proteoma plasmático y espermático.....	24
4.2.1 Anotación funcional	24
4.2.1.1 Anotación funcional de las proteínas del plasma seminal.....	25
4.2.1.2 Anotación funcional de las proteínas de la membrana de los espermatozoides....	26
4.2.2 Proteínas diferencialmente expresadas del plasma seminal	27
4.2.3 Proteínas diferencialmente expresadas en los espermatozoides.....	29
5. Conclusión.....	33
6. Bibliografía.....	35
7. Anexos.....	41

Índice de tablas

Tabla 1. Análisis de varianzas de los parámetros seminales, la fertilidad y la prolificidad del grupo de alta fertilidad (HF) y del grupo de baja fertilidad (LF).

Tabla 2. Proteínas del plasma seminal significativamente diferentes entre grupos de muestras de baja y alta fertilidad. En azul aquellas que además presentan un Fold Change (FC) $\geq 1,2$.

Tabla 3. Las 9 proteínas de la membrana del espermatozoide con un Fold Change (FC) $\geq 1,2$.

Tabla 4. Las 6 proteínas de membrana previamente Uncharacterized que se pudieron identificar mediante el Uniprot.

Tabla 5. Las 6 proteínas diferencialmente expresadas del proteoma de espermatozoides asociadas a la vía metabólica mediante el David Functional Annotation Tool, versión 6.8.

Índice de figuras

Figura 1. Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides humanos. A) Defectos de la cabeza: a) acintado, b) periforme, c) redonda, pequeña con acrosoma presente o ausente, d) amorfa, e) vacuolada, f) área acrosomal pequeña. B) Defectos del cuello y la pieza media: g) cuello doblado, h) inserción asimétrica de la pieza media, i) pieza media gruesa, j) pieza media delgada. C) Defectos de la cola: k) cola corta, l) cola doblada, m) cola enrollada. D) Defecto de la gota citoplásmica: n) gota mayor que un tercio del área de una cabeza de espermatozoide normal.

Figura 2. Tipos de movilidad de los spz: A) Progresivo rápido; B) Progresivo lento (spz-PR); móvil no progresivo (spz-NP) e inmóvil (spz-IM).

Figura 3. Comparación de las características seminales más importantes en los grupos de varones con un porcentaje elevado de fragmentación espermática vs varones con ADN íntegro. A) Evaluación de la concentración espermática, B) Movilidad progresiva, C) Movilidad no progresiva, D) Inmovilidad, E) Morfología, F) Integridad del ADN espermático por edad del varón (las gráficas representan la media) * = resultado significativo en la prueba t de student.

Figura 4. HeatMap de las proteínas del plasma seminal con diferencia significativa entre grupos de alta y baja fertilidad.

Figura 5. HeatMap de las proteínas espermáticas con diferencia significativa entre grupos de alta y baja fertilidad.

Figura 6. Gene Ontology (función molecular) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

Figura 7. Gene Ontology (procesos biológicos) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

Figura 8. Gene Ontology (entidad anatómica celular) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

Figura 9. Gene Ontology (función molecular) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

Figura 10. Gene Ontology (componente celular) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

Figura 11. Gene Ontology (proceso biológico) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

Índice de abreviaturas

Spz: espermatozoide

CRISP: Cisteína - proteínas secretoras ricas

TRA: Técnicas de Reproducción Asistida

GO: Ontología génica

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto y Genomas

SN: sobrenadante

TCG: tris-citrato-glucosa

HF: Alta tasa de fertilidad

LF: Baja tasa de fertilidad

1.Introducción

1.1. Parámetros de calidad seminal y capacidad de predicción de la fertilidad.

Es difícil predecir los resultados que se pueden obtener con una determinada muestra de semen. En general, la evaluación de parámetros clásicos, como la morfología, la motilidad y la concentración de espermatozoides y el volumen seminal, permiten identificar los eyaculados con una fertilidad deficiente, pero no realizar una predicción de alta eficiencia de la fertilidad (Jung *et al.*, 2015). La fecundación es un proceso complejo que depende de gran cantidad de factores, como la espermatogénesis; la aportación de las glándulas anejas; el tránsito, la selección y capacitación espermática; la sincronización y la calidad ovocitaria. Sin embargo, controlar la dosis seminal y proporcionar el número de espermatozoides adecuado es un factor clave para el éxito en inseminación artificial y por tanto para la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003).

Algunas deficiencias pueden no ser detectadas mediante la evaluación de los parámetros clásicos ya que afectan sutilmente a la composición lipídica o proteica del propio espermatozoide, o a la composición del plasma seminal tras la eyaculación. Durante la eyaculación, los espermatozoides procedentes del epidídimo entran en contacto con secreciones procedentes de las glándulas accesorias (bulbouretrales, seminales y la próstata que) contribuirán con diferentes iones (Zn, Cl, Mg, Se, Na o K), proteínas (interleuquinas, interferones, glutatión peroxidasa...), lípidos o ácidos grasos (prostaglandinas, esteroides, colesterol,...) , hidratos de carbono (fructosa, piruvato..) o microvesículas (con contenido diverso entre los que se puede encontrar ARN) que aportarán fuentes de energía, estabilizadores de membrana, antioxidantes o inmunomoduladores (Aviles, 2011).

Las valoraciones seminales, en la mayoría de las especies de mamíferos, se centran en descartar aquellos eyaculados que presentan una motilidad inferior al 70%, un porcentaje de formas anormales superior al 30%, o un porcentaje de espermatozoides que muestran el acrosoma reaccionado superior al 20%, obteniéndose con estos valores buenos resultados de fertilidad y prolificidad, atendiendo en cada caso a los valores de referencia de cada especie. En humana por el contrario se establece que el porcentaje de los espermatozoides móviles debe ser superior al 32%, que más de un 58% tiene que estar vivo y que tan solo más de un 4% han de ser morfológicamente normales (OMS, 2010).

1.1.1. Características del eyaculado.

El aspecto de los eyaculados forma parte importante de la evaluación de las muestras seminales, de modo que aquellos eyaculados o muestras seminales que presentan algún tipo de alteración en relación con el aspecto habitual de la especie son descartados. En casi todas las especies se tiene en cuenta el color y la apariencia, el volumen, concentración y pH, y además en la especie humana se tienen en cuenta la licuefacción y la viscosidad.

Viscosidad y licuefacción: En la eyaculación, el semen de varias especies de primates, incluida la humana, se transforma en una masa semisólida coagulada con hilos de moco y cuerpos

gelatinosos que dificultan el análisis. Para analizar la viscosidad se suele tomar una fracción de la muestra con una pipeta Pasteur y dejarla caer gota a gota, considerándose anormal cuando se forma un filamento de más de 2 cm. La licuefacción ocurre normalmente a temperatura ambiente en los primeros 15 minutos tras recoger la muestra. La no licuefacción del semen puede estar provocada por una falta de enzimas de la próstata y puede afectar a la evaluación de la movilidad de los espermatozoides (García *et al.*, 2012).

Color y apariencia: Un semen normal debería ser homogéneo, blanco opalescente, o más o menos translúcido (en algunos casos de una baja concentración de espermatozoides). Una coloración marrón-parda, es indicativo de un sangrado en el tracto genital horas o días antes de la recogida; una coloración rojiza refleja un sangrado en el momento de la toma de la muestra y el color amarillento se puede asociar a ictericia, leucospermia, niveles altos de flavoproteínas oxidadas procedentes de vesículas seminales (por elevada abstinencia en humana) o contaminación con orina. Por otro lado, un olor fecal puede deberse a la presencia de *E. coli* (García *et al.*, 2012).

Volumen: La medida del volumen se puede realizar según el manual de la OMS mediante pesada (asumiendo que la densidad del semen es 1, y por tanto un gramo corresponde a un ml) o empleando recipientes graduados (como se ve en el punto 2.4). Un volumen bajo es indicativo de alteraciones como obstrucciones de vías seminales, ausencia de conductos deferentes o eyaculación retrógrada. Un volumen alto puede ser producido por un aumento de secreción en algunas glándulas (García *et al.*, 2012). El volumen normal de los eyaculados difiere por especie, desde los 5-10 ml de la especie humana, a los 0,2 A 1ml en conejo, de 1 a 5 ml vacuno o de 200 a 300ml en porcino.

pH: Refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata. El valor adecuado del semen se encuentra entre un 7.3 y 7.8 en la mayoría de los mamíferos. Un pH por debajo de 7, unido a oligo o azospermia y a un volumen bajo, nos va a sugerir agenesia (obstrucción de la vesícula seminal o conductos deferentes) y también infección (Rodríguez *et al.*, 2018).

Concentración espermática: Según el manual de laboratorio de la OMS (2001) para el examen del semen, la concentración de los espermatozoides puede determinarse aplicando el método del hemocitómetro. Se recomiendan cámaras que tengan al menos 100 micras de profundidad y que permitan el conteo con muestras fijadas (Neubauer o Thoma). Pero también se pueden emplear otras cámaras distintas como la de Makler en la que, trabajando con muestras no fijadas, además del recuento espermático es posible realizar valoraciones de la movilidad (OMS 2001). Las muestras de los eyaculados pueden ser clasificadas en función de la concentración de espermatozoides. Se conoce como criptozoospermia a la ausencia de espermatozoides en el eyaculado tras un análisis inicial, pero presencia de estos tras la centrifugación y como azospermia a la ausencia de espermatozoides incluso tras usar un método de análisis validado. Se consideran normozoospermicas aquellas muestras que cumplen los valores de referencia que, en el caso de la especie humana, tal y como indica el 5º manual de la OMS (2010) es de ≥ 39 millones de espermatozoides por eyaculado y oligozoospermicas aquellas con una concentración inferior a los valores normales. Este, junto a otros parámetros espermáticos nos permiten determinar qué técnica reproductiva puede ser utilizada (OMS, 2010). En otras especies de mamíferos los datos habituales de producción espermática por eyaculado van desde

los 90 a 100x10⁹ de la especie porcina, de los 1500 a 3000x10⁹ en pequeños rumiantes, de los 50 a 100 millones en ratón o de los 200 a 600 millones de espermatozoides en conejo.

1.1.2. Características de los espermatozoides.

1.1.2.1. Morfoanomalías.

La morfología espermática es uno de los parámetros más importantes de selección y se correlaciona con el potencial de fertilidad, el desarrollo embrionario y la implantación. Para realizar la evaluación de la morfología espermática se han publicado diversos criterios. Uno de ellos es clasificarlas en primarias cuando reflejan anomalías producidas en el testículo, y secundarias cuando se producen durante el tránsito a través del sistema ductal o cuando se producen como consecuencia de errores de manejo del semen tras la obtención de este. Para la mayoría de los mamíferos se considera un semen de buena calidad, como aquel que debe contener más de 70% de espermatozoides con morfología normal, representando las anomalías primarias menos del 10% y las anomalías secundarias menos del 20%. Las anomalías totales no deben superar el 30%.

Anormalidades primarias: Forma de cabeza piriforme, lanceolada, angosta o estrecha; cabeza desprendida, doble, microcefalia o macrocefalia; acrosoma desprendido, rugoso o pequeño y cuello paraxial.

Anormalidades secundarias: espermatozoides con gota citoplasmática proximal o distal; cola enrollada o quebrada y acrosoma desprendido. (Rodríguez *et al.*, 2018)

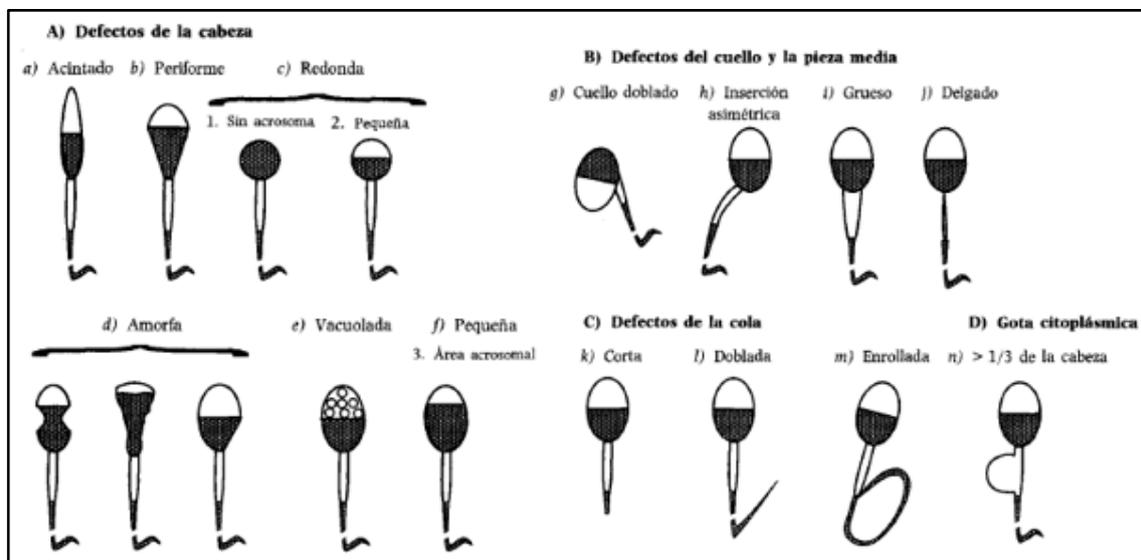


Figura 1. Dibujos esquemáticos de algunas formas anormales de espermatozoides humanos.

A) Defectos de la cabeza: a) acintado, b) piriforme, c) redonda, pequeña con acrosoma presente o ausente, d) amorfa, e) vacuolada, f) área acrosomal pequeña. B) Defectos del cuello y la pieza media: g) cuello doblado, h) inserción asimétrica de la pieza media, i) pieza media gruesa, j) pieza media delgada. C) Defectos de la cola: k) cola corta, l) cola doblada, m) cola enrollada. D) Defecto de la gota citoplasmática: n) gota mayor que un tercio del área de una cabeza de espermatozoide normal.

1.1.2.2. Movilidad y parámetros de movilidad.

La motilidad de los espermatozoides depende en gran medida de varias vías metabólicas y mecanismos reguladores, cualquier anomalía de estos factores podría ser responsable de casos de mala motilidad de los espermatozoides y, en consecuencia, infertilidad (Pereira *et al.*, 2017). Un espermatozoide inmóvil es incapaz de atravesar el moco cervical femenino y mucho menos las envolturas del ovocito.

La clasificación de los tipos de movilidad que introduce el quinto manual de la OMS ha supuesto un gran cambio con relación a manuales anteriores que diferenciaban la movilidad progresiva lenta y rápida, estableciéndose el punto de corte en 25 micras por segundo. En este se unifican en un solo tipo de movilidad, la movilidad progresiva, quedando por tanto sólo tres tipos de movilidad (OMS, 2010):

- Espermatozoides inmóviles (IM): Sin movimiento
- Espermatozoides con movilidad no progresiva (NP): Incluye todos los patrones de movilidad con ausencia de progresión como el avance en pequeños círculos.
- Espermatozoides con movilidad progresiva (PR): lineal o en círculos amplios, independientemente de la velocidad.

Esta clasificación definida inicialmente para semen humano son aplicados actualmente en todas las especies en los que se realizan obtención de eyaculados o extracción de semen bien por electroeyaculación, lavado epididimario o biopsia. En cada una de ellas se definen valores de umbrales de velocidad y parámetros de la trayectoria a partir de los cuales se establece la clasificación si ésta se realiza con un sistema CASA (Computer Assited Sperm Analysis). Si no se estima atendiendo a esquemas como el siguiente:

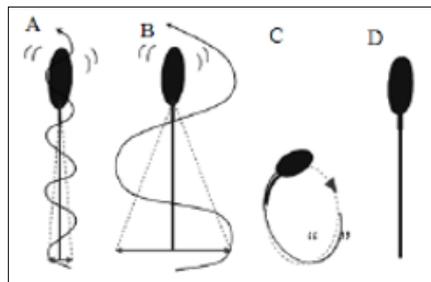


Figura 2. Tipos de movilidad de los espermatozoides (spz): A) Progresivo rápido; B) Progresivo lento (spz-PR); móvil no progresivo (spz-NP) e inmóvil (spz-IM).

Movilidad subjetiva (masal): La movilidad masal, es definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la movilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas (García *et al.*, 2012).

Movilidad objetiva: La determinación de la movilidad es una de las pruebas más utilizadas para tener una aproximación a la calidad del semen. Para evaluarla es necesario el uso de un microscopio compuesto u óptico común con objetivos de 10X y 40X (aumentos), siendo

importante el mantener el semen a evaluar y el material a utilizar a una temperatura de entre 30 a 35 °C (Mejía-Villanueva *et al.*, 2008).

La movilidad puede clasificarse como:

- Muy buena: cuando el 80 – 100 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Buena: cuando el 60 - 79 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Regular: cuando el 40 - 59 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Pobre: cuando menos del 40 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.

Es importante señalar que en algunas especies como ovinos y caprinos donde las concentraciones espermáticas son muy altas, se debe de realizar una dilución con el medio adecuado (tris glucosa, Andersen, etc.) y la temperatura pertinente para realizar esta evaluación 36 °C (García *et al.*, 2012).

Parámetros de movilidad: Un espermatozoide presenta habitualmente un movimiento sinusoidal y su trayecto se caracteriza por bastantes parámetros (OMS, 2001):

- Amplitud del giro lateral de la cabeza respecto a la pieza intermedia (ALH)
- Velocidad de progresión lineal en $\mu\text{m/s}$ (VSL): velocidad media del desplazamiento según una línea recta trazada entre la primera y la última posición detectada de la cabeza.
- Velocidad curvilínea en $\mu\text{m/s}$ (VCL): velocidad media del desplazamiento de la cabeza a lo largo de su trayectoria real, tal como se ve en dos dimensiones en el microscopio.
- Velocidad según el trayecto medio en $\mu\text{m/s}$ (VAP): velocidad media de desplazamiento de la cabeza siguiendo el trayecto medio.
- Linealidad del trayecto igual a la relación VSL/VCL.
- Media del desplazamiento angular (grados), MAD. La media de los valores del ángulo de giro instantáneo de la cabeza de los espermatozoides a lo largo de su trayectoria curvilínea.

1.1.2.3. Funcionalidad de las membranas espermáticas.

El estado de la membrana plasmática es de suma importancia debido a su papel, no sólo como límite celular, sino también por su necesidad de interacciones célula a célula, por ejemplo, entre los espermatozoides y el epitelio del tracto genital femenino y entre el espermatozoide y el ovocito (Rodríguez-Martínez, 2003).

Una característica importante en el espermatozoide es la subdivisión de la membrana plasmática en regiones que difieren en composición y función denominadas “dominios”.

el dominio de membrana de la pieza media es modificado cuando el espermatozoide pasa por el epidídimo por medio de la migración de la gota citoplasmática desde la parte anterior al final de la parte posterior del flagelo. En la cabeza hay dos subdominios de la membrana plasmática, el acrosomal y el subacrosomal. El primero cubre, el acrosoma y se caracteriza por presentar islas de colesterol y esfingolípidos anclados a proteínas integrales (caveolinas). El segundo subdominio se encuentra en la región subacrosomal, y es rico en fosfolípidos (Flesch y Gadella, 2000).

1.1.2.4. Integridad del ADN.

Actualmente, la integridad del ADN espermático es un buen parámetro para evaluar la calidad seminal y predecir el potencial de fertilidad. Según la OMS, entre un 10 y un 15% de los varones infértiles tienen parámetros normales en espermigramas, lo que hace necesario evaluar además el daño en el ADN, las alteraciones meióticas o las aneuploidías espermáticas (Machorro-Ramírez *et al.*, 2018).

La capacidad del ovocito para reparar este daño disminuye conforme aumenta la edad de la mujer y depende tanto de las condiciones citoplasmáticas como de su calidad genómica. El ADN espermático dañado y no reparado se relaciona con la expresión tardía del genoma paterno y el bloqueo en el desarrollo postimplantatorio de embriones con cariotipo normal, lo que supone el fracaso de las TRA (Machorro-Ramírez *et al.*, 2018).

Existen varias pruebas para medir la fragmentación del ADN espermático: técnica de TUNEL, COMET, técnica de dispersión de cromatina y SCSA. En todas estas se reporta una correlación negativa con las tasas de fecundación o desarrollo embrionario. La técnica de dispersión de la cromatina, basada en una descondensación inducida del ADN, resulta muy útil para determinar este parámetro. Ofrece una mejor evaluación del factor masculino en el contexto de cada grupo de diagnóstico de infertilidad, para ayudar a brindar una orientación más precisa en la terapéutica seleccionada (Machorro-Ramírez *et al.*, 2018).

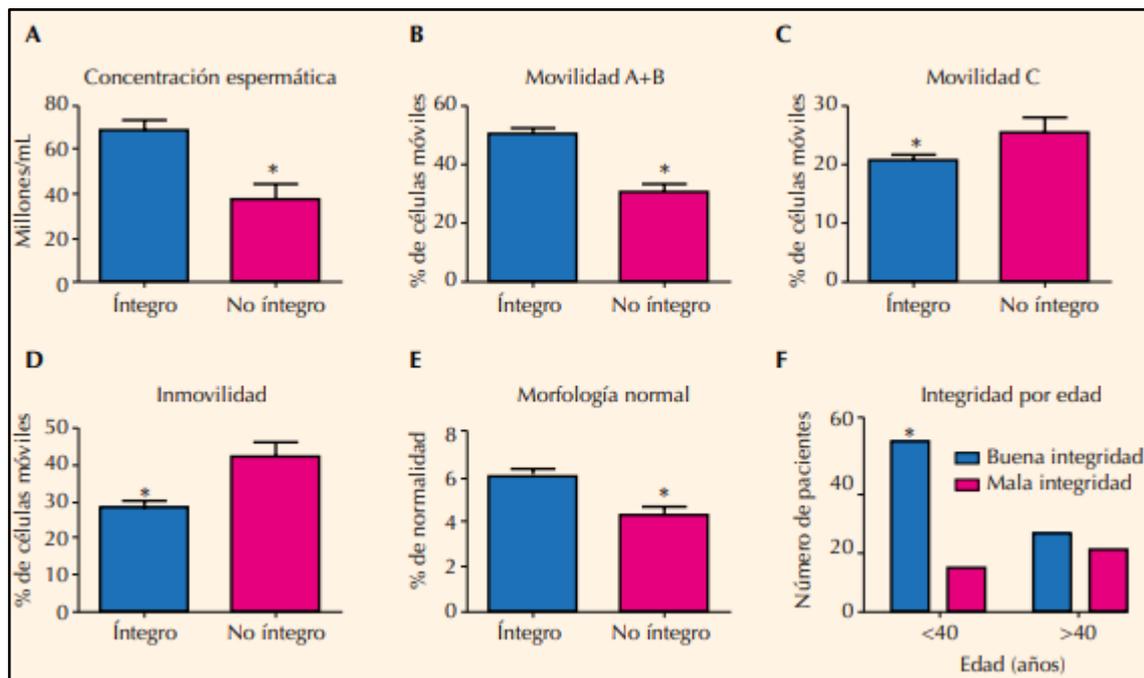


Figura 3. Comparación de las características seminales más importantes en los grupos de varones con un porcentaje elevado de fragmentación espermática vs varones con ADN íntegro. A) Evaluación de la concentración espermática, B) Movilidad progresiva, C) Movilidad no progresiva, D) Inmovilidad, E) Morfología, F) Integridad del ADN espermático por edad del varón (las gráficas representan la media) * = resultado significativo en la prueba t de student.

1.2. Biomarcadores proteicos en la composición del plasma seminal y en los espermatozoides relacionados con la capacidad fecundante.

1.2.1. Composición y función del plasma seminal.

Durante la eyaculación y su depósito en el tracto genital femenino, los espermatozoides son transportados por un fluido complejo (denominado plasma seminal) resultante de las secreciones de las glándulas accesorias, el epidídimo y los testículos (Druart *et al.*, 2019).

La composición del plasma seminal es compleja, además de agua nos encontramos: iones como el Zinc (agente antibacteriano y estabilizados de macromoléculas) y el calcio (importante en la capacitación y la reacción acrosómica); sustancias energéticas como la fructosa, el inositol o el ácido cítrico y ascórbico; ácidos orgánicos como el ácido glutámico, la carnitina, la taurina o la hipotaurina que además de ser una fuente de energía dan protección frente a sustancias oxígeno reactivas; y numerosas enzimas (fosfatasa, nucleasa, acrosinas, proteasas y superóxido dismutasa) que intervienen en el proceso de licuefacción seminal, penetración del ovocito y digestión de espermatozoides muertos o dañados. (Aviles, 2011)

Respecto al papel que desempeña el plasma, se ha observado que su interacción con los espermatozoides induce la unión de las proteínas seminales a la superficie del espermatozoide y la remodelación de la membrana, lo que afecta al transporte, la supervivencia y la capacidad de fertilización de los espermatozoides en el tracto genital femenino. Además, el plasma seminal también juega un papel indirecto en la reproducción a través de la activación de mecanismos inflamatorios e inmunes en la hembra (Druart y Graaf, 2018).

Las proteínas del plasma seminal han sido objeto de mucho interés y los estudios proteómicos globales de los últimos 15 años han revelado una diversidad y complejidad hasta ahora desconocidas. En mamíferos, muchas de ellas se pueden clasificar como proteínas Fn-tipo II (moduladoras), CRISP (relacionadas con la función de defensa y el bloqueo de los canales iónicos) o espermadhesinas (para reconocimiento de gametos (Druart *et al.*, 2019).

El proteoma del plasma seminal del perro muestra una composición marcadamente desequilibrada. De las 268 proteínas reveladas la arginina esterasa y la lactoferrina son cuantitativamente principales. En camélidos ocurre algo similar, siendo el factor de crecimiento del nervio beta la proteína mayoritaria de las 20 detectadas (Druart y Graaf, 2018).

Los primeros estudios del proteoma del plasma seminal en verraco ya indicaron una alta prevalencia de espermadhesinas (Druart y Graaf, 2018). En un estudio más actual, se identificaron 872 proteínas. Entre estas, nos encontramos proteínas que participan en la regulación de la respuesta inmune del tracto reproductor femenino hacia espermatozoides y embriones (PSP-I, PSP-II, factor del complemento H, inhibidor de la proteasa C1 plasmática, catepsina H, dipeptidil peptidasa 4 y factor de crecimiento transformante $\beta 2$) y también un 3% de enzimas que participan en la activación espermática entre otras cosas. Sin embargo, son muy pocas las proteínas identificadas (menos del 6%), que se anotan como directamente involucradas en los procesos reproductivos. Las proteínas se dedican principalmente a actividades catalíticas y de unión y participan en procesos moleculares y celulares (Roca *et al.*, 2020)

En conejo, se ha demostrado que los niveles elevados de actividad aminopeptidasa del plasma seminal se relacionan con tasas de espermatozoides anormales y porcentajes más bajos de cresta apical normal, aunque no se observan efectos sobre la fertilidad (Juárez *et al.*, 2020)

Recientemente, se ha analizado el efecto del origen genético en el proteoma seminal y espermático de dos líneas de conejo. Identificaron 402 y 487 proteínas en el plasma seminal y los espermatozoides, respectivamente, lo que demuestra que el genotipo tiene un gran impacto en la abundancia de proteínas en los eyaculados de conejo (Casares-Crespo *et al.*, 2019)

Por último, se identificaron 137 proteínas plasmáticas seminales diferentes e identificaron asociaciones potenciales entre el proteoma principal del plasma seminal y algunos rasgos del semen en conejos. Entre otros hallazgos, observaron que la motilidad espermática tenía una asociación positiva con el factor de crecimiento beta-nervioso y la proteína secretora cisteinérgica 1-like y una negativa con la galectina-1, que la membrana espermática intacta estaba relacionada con el complejo de proteínas del plasma seminal FAM115 y la tropomiosina o que los espermatozoides morfológicamente normales estaban positivamente relacionados con la molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 6-like y regulados a la baja por la isocitrato deshidrogenasa del plasma seminal (Bezerra *et al.*, 2019)

1.2.2. Origen y función de biomarcadores proteicos encontrados en el plasma seminal.

Proteínas con zinc: El zinc es un catión específico del plasma seminal dotado de poder bactericida que se ha visto que juega un papel de guardián en los gametos. (García *et al.*, 2012). Concentraciones altas de Zn^{2+} en el líquido seminal prostático ayudan en la defensa de la capacitación espermática prematura y proporciona actividad antioxidante, mientras que concentraciones más bajas de Zn^{2+} son requisito para una exocitosis acrosomal exitosa (Kerns *et al.*, 2018).

El Zinc es transportado por el citrato y numerosas proteínas. Son muchas las que interactúan y contienen Zn desde la espermatogénesis hasta los pasos preparatorios finales de la fertilización (Kerns *et al.*, 2018). Un ejemplo de este tipo de proteínas es la glicoproteína alfa de zinc (ZAG) que se considera un marcador negativo de conservación. En la especie humana, la ZAG es secretada por la próstata se une a la superficie de los espermatozoides en el momento de la eyaculación y estimula la movilidad de los espermatozoides a través de la vía del AMP cíclico (Druart y Graaf, 2018).

Para comprender completamente el papel biológico del Zn^{2+} en la fertilidad masculina, es necesario realizar más investigaciones, especialmente para revelar completamente el proteoma del esperma que interactúa con el Zn. Además, se ha descubierto que la suplementación es beneficiosa para la fertilidad masculina y podrían aprovecharse estos iones para mejorar el rendimiento reproductivo del ganado entre otras cosas (Kerns *et al.*, 2018).

Fosfatasa ácida: es una enzima activa en la desfosforilación de los ésteres ortofosfóricos. La isoenzima hallada en el esperma es específica de la próstata (García *et al.*, 2012).

Marcadores del epidídimo

L-carnitina: Está en dos formas en el esperma: L-carnitina y acetilcarnitina. Desempeña un papel en la adquisición de la movilidad progresiva, es un transportador de ácidos grasos. Es el

marcador del cuerpo y la cola del epidídimo, pero no es secretada por las células de la cabeza. Existe una pequeña secreción extraepididimaria del orden del 15 al 20%.

α 1,4 glucosidasa neutra: Es una hidrolasa que está en dos formas en el esperma: una forma ácida de origen prostático y una neutro epididimaria. En el epidídimo desempeñaría un papel en la maduración de los espermatozoides. Sólo es segregada en el cuerpo del epidídimo. Existe una débil secreción extraepididimaria, inferior al 10% (García *et al.*, 2012).

1.2.3. Biomarcadores proteicos en los espermatozoides y su relación con las características espermáticas y su funcionalidad.

La evaluación de la calidad del esperma basada en biomarcadores agrega valor al análisis del semen para el tratamiento de la infertilidad masculina y la mejora del rendimiento reproductivo.

El enfoque basado en biomarcadores "negativos" se centra en proteínas y ligandos de lectina que son detectables predominante o exclusivamente en espermatozoides defectuosos. Se tratan de indicadores de la morfología y función de los espermatozoides que se asocian con una fertilidad reducida o una esterilidad completa.

A diferencia del análisis de semen con microscopio óptico convencional, el enfoque de biomarcadores negativos detecta defectos en los espermatozoides a nivel molecular, independientemente de si se manifiestan o no en un fenotipo morfológico visible o en una motilidad espermática disminuida. A continuación, tenemos algunos ejemplos:

Tiorredoxina SPTRX3 / TXNDC8: Estas moléculas, se consideran biomarcadores negativos al quedarse retenidas en las vacuolas nucleares y el citoplasma superfluo de los espermatozoides humanos defectuosos. Las parejas infértiles con SPTRX3 en semen alto tienen menos probabilidades de concebir mediante TRA y son más propensas a sufrir un aborto espontáneo recurrente, mientras que el SPTRX3 bajo se ha asociado con partos múltiples de ART.

Peroxiredoxinas: Estas proteínas redox que impactan en la función de los espermatozoides de mamíferos actuando como peróxido de hidrógeno reductasas. Se han observado niveles reducidos y un estado altamente oxidado de PRDX4 en los espermatozoides de hombres infértiles. También se encontraron en niveles reducidos de la proteína PRDX1, en el plasma seminal de hombres con astenozoospermia idiopática, posiblemente contribuyendo al aumento de los niveles de ROS y a la reducción de la motilidad de los espermatozoides.

Ubiquitina: El contenido elevado de ubiquitina en el semen se correlaciona con los resultados de fertilidad y los parámetros convencionales del semen en humanos y animales, y puede medirse mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-ubiquitina y fluorocromos con afinidad por los agregados celulares de proteínas ubiquitinadas origen espermiogénico).

En toros domésticos, la ubiquitinación de la superficie de los espermatozoides se correlaciona positivamente con el daño acrosómico y del ADN y negativamente con los parámetros convencionales del semen (recuento de espermatozoides, motilidad de los espermatozoides, % de morfología normal) y las tasas de concepción en IA. En los seres humanos el aumento de la

ubiquitinación de los espermatozoides coincide con un aumento del daño del ADN y una menor motilidad en los seres humanos y se asocia con teratospermia y astenozoospermia.

PAWP: Los niveles de PAWP de espermatozoides, medidos por FC, están altamente correlacionados con el éxito de la fertilización después de ICSI, independientemente de otros factores como la edad masculina / femenina y el recuento de espermatozoides, la morfología, la motilidad y la fragmentación del ADN. Al mismo tiempo, se encontró que los niveles de PAWP de los espermatozoides se correlacionaron significativamente con el desarrollo embrionario temprano exitoso después del TAR y un menor número de embriones detenidos dentro de los 3-5 días posteriores a la ICSI. Esto sugiere un papel importante para PAWP no solo en el inicio de las oscilaciones de calcio en la fertilización, sino también en el mantenimiento del desarrollo embrionario normal, ya que el patrón de oscilaciones de calcio puede afectar el desarrollo embrionario previo a la implantación en ratones. Las mediciones basadas en FC también sugirieron que se puede detectar una subpoblación de espermatozoides con niveles heterogéneos de PAWP en una muestra de semen individual, lo que resalta la necesidad de examinar la muestra de esperma e idealmente elegir el espermatozoide con un nivel de PAWP normal para ICSI.

Lectinas LCA: Por último, la unión espermática de las lectinas LCA (*Aglutinina de Lens culinaris*; revela alteración de la superficie de los espermatozoides) y PNA (*Arachis hypogaea*/ aglutinina de maní; revela malformación o daño acrosómico). La proteína de unión al dominio de la envoltura postacrosomal de la Primera Guerra Mundial (PAWP), implicada en la activación de los ovocitos durante la fertilización, es ectópica o está ausente en los espermatozoides humanos y animales defectuosos (Sutovsky *et al.*, 2015).

2. Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron evaluar cómo el proteoma del plasma seminal y de los espermatozoides puede influir sobre la fertilidad. Para ello se utilizarán los eyaculados de tres grupos de 10 machos de conejo de los que antes de elaborar las dosis seminales para inseminación, se obtuvieron muestras del plasma seminal y de los espermatozoides para evaluar el proteoma.

3. Materiales y métodos

Todos los productos químicos, a menos que se indique lo contrario, eran de grado reactivo y comprados a Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, España). Todos los procedimientos experimentales utilizados en este estudio se realizaron de acuerdo con los principios de cuidado de los animales publicados por el Real Decreto 53/2013 (BOE 2013) y la Directiva 2010/63/UEEC para la experimentación con animales y fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universitat Politècnica de València.

3.1. Animales

Se utilizaron 30 machos distribuidos en tres grupos de 10 de la línea genética R de la Universitat Politècnica de València. La línea R es una línea paterna seleccionada a lo largo de 36 generaciones por ganancia diaria desde los 28 hasta los 63 días de edad. La selección se basa en valores fenotípicos de ganancia diaria y se realiza en generaciones no solapadas. Las condiciones ambientales se mantuvieron con un sistema de control de la luz (fotoperiodo 16:8 luz/oscuridad), con libre acceso al agua y a dietas comerciales peletizadas (mínimo de 15 g de proteína bruta por kg de materia seca, 15 g de fibra bruta por kg de MS y 10,2 MJ de energía digestible por kg de materia seca).

Para realizar el estudio de fertilidad y prolificidad se utilizaron un total de 399 hembras comerciales cruzadas a partir de líneas seleccionadas maternas. Las hembras se mantuvieron en condiciones ambientales similares a las descritas

3.2. Diseño experimental

De cada grupo de 10 machos se obtuvo el semen mediante vagina artificial, los eyaculados individuales fueron valorados atendiendo a su aspecto, movilidad y morfología. Solo los eyaculados de color blanco con más de un 70% de movilidad y menos de un 30% de espermatozoides anormales fueron mezclados dentro de un mismo grupo. De los eyaculados seleccionados y mezclados, se obtuvo en primer lugar una muestra para su posterior evaluación y análisis del proteoma y, en segundo lugar, siguiendo las recomendaciones para esta especie se elaboraron las dosis seminales para su uso en inseminación (inseminaciones heteroespérmicas y 20 millones de espermatozoides por dosis seminal y coneja). En cada una de las 3 sesiones de inseminación se utilizaron entre 40 y 50 dosis de seminales de cada uno de los grupos de machos.

Una vez obtenidos los resultados de fertilidad las muestras fueron catalogadas de alta (4) o baja fertilidad (4) mediante una análisis cluster y comparados los proteomas del plasma seminal y de los espermatozoides.

3.3. Recolección de semen

A los 5 meses de edad, los machos iniciaron un periodo de entrenamiento de cuatro semanas con vaginas artificiales en el que se recogió un eyaculado por macho semanalmente. La recogida de semen se realizó con una coneja receptiva y se registró la respuesta de los machos al procedimiento de recogida durante el periodo de entrenamiento hasta el inicio del periodo experimental.

En el momento de su utilización todos los machos tenían una edad comprendida entre los 12 y 18 meses. Las colectas se realizaron el mismo día; se recogió un eyaculado por macho y por semana para evaluar los parámetros seminales. Sólo se utilizaron en el experimento los eyaculados que presentaban un color blanco; si el primer eyaculado de un macho presentaba signos de contaminación por orina, sangre o heces era desestimado y se procedía a una segunda recolección 20 minutos después. En el caso de obtener una fracción de gel esta fue retirada antes del inicio de la valoración individual de los eyaculados.

3.4. Evaluación de los eyaculados

3.4.1. Evaluación inicial de los eyaculados de cada grupo de machos.

Una muestra de 10 μ l de cada eyaculado fue diluida 5 veces con un diluyente habitual de conejo (40 μ l de Tris-citrato-glucosa, TCG: 250 mM de trishidroximetilaminometano, 83 mM de ácido cítrico, 50 mM de glucosa, pH $6,8 \pm 7,0$, 300 mOsm/kg⁻¹) y observada la movilidad de los espermatozoides a 100X bajo óptica de contraste de fases, estimando su movilidad por dos observadores. Solo si el 70% de los espermatozoides están en movimiento, la muestra fue catalogada como aceptable.

Una vez valorada la movilidad, se adicionó 10 μ l de una solución de glutaraldehído al 0,25% para fijar los espermatozoides y estimar el porcentaje de espermatozoides que presentaban alguna anomalía morfológica. Solo aquellos eyaculados con menos del 30% de espermatozoides anormales fueron catalogados como aceptables.

Una vez seleccionados los eyaculados en cada grupo, estos fueron mezclados para su evaluación definitiva y la elaboración de las dosis seminales.

3.4.2. Evaluación y elaboración dosis seminales a partir de las mezclas espermáticas de cada grupo de machos.

El volumen de la mezcla de los eyaculados seleccionados de cada grupo se midió en un tubo graduado. Para determinar la concentración de espermatozoides, se diluyeron alícuotas de cada grupo a razón de 1:50 con una solución de glutaraldehído al 0,25% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, utilizando una cámara de recuento de células Thoma-Zeiss (Marienfeld, Alemania). El total de espermatozoides por eyaculado (TSE) se calculó utilizando el volumen y la concentración de cada eyaculado.

Teniendo en cuenta el volumen y la concentración de cada mezcla, ésta fue diluida con el diluyente de semen de conejo hasta alcanzar la concentración de 40 millones por ml. Esto permite inseminar a las conejas según las recomendaciones para esta especie con 0,5ml por coneja y un total de 20 millones de espermatozoides.

3.4.2.1 Morfología espermática e integridad acrosómica de las mezclas espermáticas.

Para evaluar el porcentaje de integridad del acrosoma (cresta apical normal) y el porcentaje de formas anormales (cabeza y colas anormales) de las mezclas, se utilizó la alícuota preparada para el cálculo de la concentración (se fijó una muestra de 10 μ l de cada una de ellas con 490 μ l de una solución de glutaraldehído (0,25% en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) y se examinaron las muestras bajo un microscopio óptico de contraste de fase con un aumento de x400.

3.4.2.2. Parámetros de motilidad espermática de mezclas espermáticas.

Una alícuota de cada una de las mezclas se diluyó en un diluyente de tris-citrato-glucosa para obtener una concentración de 30×10^6 espermatozoides/ml. A continuación, una alícuota de cada muestra se ajustó a $7,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml con diluyente TCG suplementado con 2 g/L de BSA, luego 10 μ l se colocaron en una cámara de recuento Makler precalentada a 37°C en una placa térmica y se evaluaron en un Sistema Integrado de Análisis de Semen v. 1.0.17 (ISAS; Projectes i Serveis R + +D S.L.).

El sistema se configuró para registrar imágenes a 30 fotogramas/s. La motilidad se evaluó a 37°C a 200X utilizando un microscopio de contraste de fase negativo. Para cada muestra, se analizaron seis campos microscópicos y se evaluó un mínimo de 400 espermatozoides evaluados. La velocidad curvilínea (VCL, la velocidad media medida sobre la trayectoria real punto a punto seguida por la célula), la velocidad en línea recta (VSL, la velocidad media medida en línea recta desde el principio hasta el final de la pista), la velocidad media de la trayectoria (VAP, la velocidad media de la trayectoria de la célula suavizada), índice de linealidad (LIN; el valor medio de la relación VSL/VCL), la rectitud (STR, la relación entre VSL y VAP), bamboleo (WOB = $(VAP/VCL) \times 100$, una medida de la oscilación de la trayectoria real en torno a su trayectoria media), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, la de la oscilación de la cabeza a medida que los espermatozoides nadan) y la frecuencia cruzada de batido (BCF, la frecuencia con la que la cabeza del espermatozoide cruza la trayectoria media en cualquier dirección). Todas las capturas se guardaron y analizadas posteriormente. Antes del análisis de campo, se procedió a identificar cada trayectoria de los espermatozoides para eliminar los restos (falsas capturas) y reducir el riesgo de confundir las trayectorias.

3.4.2.3. Viabilidad y análisis HOST.

El porcentaje de espermatozoides viables se determinó mediante una tinción fluorescente dual con SYBR-14/PI según Viudes-de-Castro *et al.* (2014). Un mínimo de 100 espermatozoides se

contaron por eyaculado, y sólo los porcentajes de espermatozoides vivos fueron considerados en los resultados (SYBR-14-positivo y PI-negativo). Todas las diluciones se realizaron a 22 °C.

El test hiposmótico (HOST) se utilizó para evaluar la integridad funcional de la membrana espermática (Jeyendran *et al.*, 1984). El semen se diluyó 1:20 en una solución HOST de 75 mOsm a 25-30 °C durante 15 minutos. Se evaluó un mínimo de 100 espermatozoides y se calculó HOST como el porcentaje de espermatozoides con colas enrolladas hinchadas/ total de espermatozoides.

3.4.3. Procedimiento de inseminación

Todas las hembras utilizadas en este experimento eran multíparas cruzadas y fueron sincronizadas con 12UI de eCG inyectada intramuscularmente 60 h antes de ser inseminadas. La inseminación se llevó a cabo entre el 10 y el 12 día posparto y se indujo a las hembras a ovular utilizando un análogo sintético de la GnRH análogo sintético de la GnRH (1 µg de acetato de busarelina, Hoechst) inyectado por vía intramuscular. Se inseminaron 20 millones de espermatozoides totales por hembra (0,5 ml de semen/hembra), utilizando una pipeta curva de plástico. Las hembras fueron asignadas al azar. La tasa de partos (número de hembras paridas/número de hembras inseminadas) y la prolificidad (número de crías totales nacidas) fueron los reproductivos.

3.5. Muestras de extracción de plasma y proteínas espermáticas

Antes de preparar las dosis de esperma, se tomó una muestra de 500 µl de los conjuntos de eyaculados se centrifugó a 7400 x g durante 10 min a 22 °C. Los sobrenadantes (plasma seminal) se recogieron, se complementaron con un cóctel de inhibidores de proteasas al 1% v/v (P2714, Sigma) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Los pellets resultantes se lavaron dos veces por centrifugación a 900 x g durante 10 minutos en PBS. Las proteínas de los espermatozoides se extrajeron según el protocolo de Casares-Crespo *et al.* (2019). Brevemente, los pellets de esperma se resuspendieron en SDS al 1% (p/v) en TCG (Tris-citrato-glucosa suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas al 1% v/v, P2714) y se sonicaron en hielo 6 veces durante 5 s a una amplitud del 30% utilizando un homogeneizador ultrasónico de laboratorio UP 100 H (Hielscher Ultrasonics GmbH). Tras la sonicación, la solución se mantuvo en hielo durante 15 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 g a 4°C. Los lisados de proteínas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.6. Análisis de cuantificación relativa proteómica: Análisis SWATH MSMS.

Los análisis proteómicos se realizaron en el SCSIE de la Universitat de València (Plataforma Proteómica ProteoRed PRB3-ISCI).

La concentración inicial de proteínas del plasma seminal se midió mediante Nanodrop (Thermo Scientific) utilizando muestras diluidas (1 a 10) en agua ultrapura y la concentración de la

muestra de proteínas del esperma mediante kit de cuantificación Machery Nagel (Ref. 740967.50), siguiendo el protocolo del fabricante. Se preparó un pool de plasma seminal y otro con muestras de esperma con 50 µg de proteína y se resolvió en PAGE 1D gel.

3.6.1. Construcción de bibliotecas espectrales

Digestión de proteínas en gel: 5 portaobjetos de cada gel fueron digeridos con tripsina de grado de secuenciación (Promega) tal y como describen Shevchenko *et al.* (1996). Los portaobjetos de gel se digirieron utilizando 200 y 400 ng de tripsina y la digestión se ajustó a 37 °C (en los portaobjetos de semen y de esperma, respectivamente). La digestión con tripsina se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) y se eliminó el sobrenadante (SN), luego se deshidrataron. Los portaobjetos de gel de la biblioteca se deshidrataron con acetonitrilo puro (ACN).

Las nuevas soluciones peptídicas se combinaron con el correspondiente SN. Las mezclas de péptidos se secaron en un sistema de vacío rápido (ISS 110 SpeedVac System, Thermo Savant, ThermoScientific, Langensfeld, Alemania) y se resuspendieron en ACN al 2%; TFA al 0,1%. Los volúmenes se ajustaron según la intensidad de la tinción.

Análisis de adquisición dependiente de datos (DDA) por LCMSMS: se cargaron 5 µl de los fragmentos digeridos en una columna trampa (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 75µ x 15 cm; Eksigent) y se desalaron con TFA al 0,1% a 3 µl/ min durante 5 min. Los péptidos se cargaron en una columna analítica (Column LC, 3µ C18-CL, 75µ x 12 cm, Nikkyo Technos, Tokio, Japón) equilibrada en ACN al 5% y ácido fórmico al 0,1% (FA). La elución de los péptidos se realizó con un gradiente lineal del 5 al 35% de disolvente B durante 60 minutos (A: 0,1% de FA en agua; B: 0,1% de FA en ACN) a un caudal de 300 η/min.

Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). El tripleTOF funcionó en modo de adquisición dependiente de la información, en el que se realizó un barrido de MS TOF de 250 ms de 350 a 1250 m/z, seguido de barridos de iones producto de 150 ms de 350 a 1500 m/z en los 25 iones de carga 2-5 más intensos. Las energías de colisión rodante 3 ecuaciones se establecieron para todos los iones como para los iones 2+, de acuerdo con las siguientes ecuaciones: $|CE| = (\text{pendiente}) \times (m/z) + (\text{intercepción})$.

3.6.2. Motor de búsqueda ProteinPilot v5.0. (Sciex)

Se utilizaron los parámetros por defecto de ProteinPilot para generar una lista de picos directamente desde 5600 archivos wiff de TripleTof. Se utilizó el algoritmo Paragon de ProteinPilot para buscar en la base de datos UniprotMammalia (03.2018) con los siguientes parámetros especificidad de tripsina, cys-alquilación, sin restricción de taxonomía, y el esfuerzo de búsqueda establecido a través y la corrección de la tasa de falsos descubrimientos (FDR) para las proteínas. La agrupación de proteínas se realizó mediante el algoritmo Pro-group. En este caso, la formación de grupos de proteínas se guía totalmente por péptidos observados, que se originan en los espectros adquiridos experimentalmente. Por ello, se puede considerar que la agrupación está guiada por el uso de los espectros.

3.6.3. Análisis de las muestras

Digestión de proteínas de las muestras de plasma seminal: 25 µg de cada muestra se redujeron con ditioneitol (DTT) 2 mM; Vf=25µ L) durante 20 min a 60°C. Los grupos tiol se alquilaron con 5,5 mM de yodoacetamida (IAM, Vf=30 µL) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. El exceso de IAM se apagó con DTT 10 mM (Vf=60 µL) a 37°C durante 1 h Para la digestión de las proteínas, se añadieron 500 ng de tripsina (Vf=65 µL) y se dejó la digestión toda la noche. Todos los reactivos se prepararon en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM. La digestión de las proteínas se detuvo con 5 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 10% en agua. El volumen final de la mezcla volumen de la mezcla fue de 70 µL. Las muestras se concentraron mediante un evaporador rotatorio hasta 25 µL. Las inyecciones individuales de SWATH se realizaron al azar en bloques.

Muestras de esperma de digestión de proteínas: las mezclas de gel de proteínas se digirieron como describen Shevchenko *et al.* (1996), utilizando 500 ng de tripsina para cada muestra y la digestión se ajustó a 37 °C. La digestión con tripsina se detuvo con TFA al 10% y se eliminó el SN, después se deshidrataron los portaobjetos de gel de la biblioteca con ACN puro. Las nuevas soluciones peptídicas se combinaron con la correspondiente SN. Las mezclas de péptidos se secaron en un vacío rápido y se resuspendieron en ACN al 2%; TFA al 0,1%. El volumen se ajustó a una concentración final de 0,5 µg/µL.

Análisis LCMSMS de SWATH: 5 µl de cada muestra fueron cromatográficamente resuelto como en 2.6.1 pero con un gradiente de 120 minutos. El triple TOF se operó en modo Swath, en el que un barrido TOF MS de 0,050 s de 350 a 1250 m/z, seguido de un barrido de iones producto de 0,080 s de 350 a 1250 m/z en las 32 ventanas definidas (3,05 s/ciclo).

Las ventanas de barrido utilizadas fueron 15 Da de ancho de ventana de 450 a 1000 Da, 37 ventanas. Cuantificación de proteínas: los archivos wiff obtenidos del experimento Swath fueron analizados con Peak View 2.1. Los ajustes de procesamiento utilizados para la selección de péptidos fueron: un número máximo de péptidos por proteína de 20, un número de transiciones o iones de fragmentos por péptido de 6, un umbral de confianza del péptido superior al 95% y menos del 1% de FDR.

Después de la detección de péptidos, se alinearon los péptidos entre diferentes muestras utilizando los péptidos detectados de alta confianza de la biblioteca. Los péptidos con el tiempo de retención correlacionado se extrajeron utilizando el citado conjunto de procesamiento con 10 min de extracción del cromatograma de iones. Se analizaron un total de 6 muestras y se analizaron 643 proteínas del plasma seminal y 1362 proteínas de esperma fueron cuantificadas. Los datos proteómicos y los archivos de resultados del análisis han sido depositados en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio de socios PRIDE (identificador de datos PXD015510 y PXD015516 y, PXD015511 y PXD015517 para los datos de esperma y plasma seminal, respectivamente). El análisis bioinformático de las proteínas plasmáticas y espermáticas identificadas se realizó utilizando la herramienta bioinformática integral para la funcional UniProt KB (www.uniprot.org) en combinación con la herramienta con David Functional Annotation Tool, versión 6.8 (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b) (<https://david.ncifcrf.gov/>).

3.7 Análisis estadísticos

Los datos de expresión proteica ya normalizados por el servicio SCSIE fueron analizados mediante el software MeV 4.9.0 (Saeed *et al.*, 2003) (<https://mev.tm4.org/>). Se utilizó el Software ClustVis (Metsalu y Vilo, 2015) (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) para realizar el Heatmaps de las proteínas diferencialmente expresada ($p < 0.05$). En el caso de que las proteínas diferencialmente expresadas no estuvieran anotadas inicialmente, se realizó una nueva búsqueda en UniProt KB (www.uniprot.org). Finalmente se realizó un análisis de los términos GO con UniProt y vías KEGG con David Functional Annotation Tool, versión 6.8 (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b) (<https://david.ncifcrf.gov/>).

4. Resultados y discusión.

4.1. Parámetros espermáticos, fertilidad y prolificidad de las muestras.

En la tabla 1 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los parámetros seminales de las 8 mezclas de eyaculados agrupadas en función de su fertilidad. Las muestras no difieren en los parámetros espermáticos, ya que fueron preparadas según los criterios de elaboración de dosis para esta especie, que además de desestimar los eyaculados con movilidad total inferior al 70% y con un porcentaje de espermatozoides anormales igual o superior al 30%, elabora sus dosis seminales a partir de mezclas heteroespérmicas (eyaculados de diferentes machos). No obstante, se observa que a pesar de que no hay diferencias estadísticamente significativas en los valores de movilidad espermática, el análisis CASA de las mezclas heteroespérmicas, catalogadas a posteriori como de baja fertilidad son ligeramente inferiores a los estimados en la evaluación individual de los eyaculados, aunque no difieren estadísticamente. En cualquier caso, los resultados demostraron que el análisis a priori de parámetros espermáticos como la movilidad, porcentaje de anormales, estado del acrosoma, viabilidad o el test hiposmótico no permitieron discriminar las mezclas heteroespérmicas de las que se obtendrían los mejores resultados o los peores tras la inseminación. Es por ello que es necesario encontrar otros parámetros o biomarcadores que ayuden a discriminar los eyaculados o dosis de inseminación de menor fertilidad. En especies social o económicamente más importantes, la evaluación de la integridad del ADN o el proteoma son cada vez más frecuentes para prevenir y solucionar problemas reproductivos (humana) o para detectar machos de menor fertilidad y eliminarlos de los centros de selección y de los inseminación (vacuno y porcino).

Además, puede observarse que las diferencias en fertilidad (porcentaje de conejas gestantes) no se manifiestan a nivel de prolificidad (Tabla 1). Las conejas que resultan gestantes tras la inseminación obtienen una prolificidad similar en ambos grupos. Estos resultados, sugieren una interacción entre la dosis seminal, el periodo transcurrido hasta la inseminación (inferior a 4h) y el historial reproductivo de la coneja que condicionan el transporte y ambiente endometrial y oviductal y, consecuentemente la capacitación y el proceso de fecundación (Theau-Clément *et al.*, 2016). El resultado final fue que las dosis del grupo de baja fertilidad tuvieron mayor dificultad para fecundar con éxito, siendo este un proceso de todo o nada en estas especies políticas. Por otra parte, la utilización de la dosis recomendada en esta especie (20 millones de espermatozoides, Castellini, 1996), probablemente facilita en estos casos un fenómeno de compensación espermática que permite que un 63% de las conejas pueda culminar con éxito el proceso reproductivo. Diferentes autores han demostrado que es posible obtener buenas tasas de fertilidad con inseminaciones con más 4 millones de espermatozoides a nivel de granja (Viudes-de-Castro y Vicente, 1997), y con tan solo 100.000 espermatozoides a nivel de laboratorio tras seleccionar los espermatozoides mediante un gradiente de densidad (Farrell *et al.*, 1993).

Tabla 1. Parámetros seminales, fertilidad y prolificidad del grupo de alta fertilidad (HF) y del grupo de baja fertilidad (LF).

Parámetro	Grupo	Media ± error estándar
Motilidad total	HF	76,3 ± 5,37
	LF	65,5 ± 5,37
Motilidad progresiva	HF	49,3 ± 4,27
	LF	39,5 ± 4,27
Anormales	HF	21,9 ± 3,12
	LF	21,5 ± 3,12
Acrosoma normal	HF	81,8 ± 6,88
	LF	81,9 ± 6,88
Viabilidad	HF	62,6 ± 6,60
	LF	53,6 ± 6,60
Host	HF	48,1 ± 5,32
	LF	45,0 ± 5,32
Fertilidad	HF	80,0 ± 0,98 ^a
	LF	63,9 ± 0,98 ^b
Prolificidad	HF	12,0 ± 0,28
	LF	11,9 ± 0,28

^{a,b} Valores con diferente superíndice difieren significativamente (P<0.05).

4.2. Proteoma plasmático y espermático

4.2.1 Anotación funcional.

Antes de comenzar con la verdadera anotación funcional se realizó una ligera búsqueda en UniProt introduciendo los ID de algunas de las Uncharacterized protein (como G1TZR6_RABIT, S9WRK9_CAMFR, S9YPJ3_CAMFR, G1TZA1_RABIT o W5NS59_SHEEP) y se observó que muchas de estas ya estaban caracterizadas. Por ello, antes de proceder a la realización de los HeatMaps se introdujo en el ID Mapping el identificador de las 12 proteínas de membrana desconocidas. Tal y como muestra la tabla 4, se lograron identificar 6 y se dejó el ID de las otras 6 (G1SKN0, G1TE07, G1T3K6, U3KP50, W5QEW0 y G1TM92) como nombre para poder distinguir fácilmente unas de otras y analizar su expresión.

Tabla 4. Las 6 proteínas de membrana previamente Uncharacterized que se pudieron identificar mediante el Uniprot.

ID	Protein name
G1SF28	Peptidase M60 domain-containing Protein
G1T5J0	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
G1U822	SERPIN domain-containing Protein
G1T678	Acetyl-CoA acetyltransferase 2
G1TPV7	COX6C domain-containing Protein
G1U593	UPAR/Ly6 domain-containing protein

Se estudiaron también las vías KEGG con David Functional Annotation Tool, versión 6.8 (Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b) (<https://david.ncifcrf.gov/>). Se partió de 42 de las proteínas diferencialmente expresadas en los espermatozoides y se observó que 6 de estas estaban afectando a la vía metabólica (tabla 5). Dentro de este pequeño grupo de 6 proteínas, la acetyl-CoA acetyltransferase 2, la aldolase, fructose-bisphosphate A y la pyruvate kinase, muscle aparecen implicadas en el metabólica del carbono. Además, la aldolase y pyruvate kinase están involucradas también en el metabolismo del piruvato. Por tanto, podemos afirmar que la expresión diferencial de ciertas proteínas estaría afectando al metabolismo energético de los espermatozoides.

Tabla 5. Las 6 proteínas diferencialmente expresadas del proteoma de espermatozoides asociadas a la vía metabólica mediante el David Functional Annotation Tool, versión 6.8.

KEGG PATHWAY	Protein name
Metabolic pathways	Acetyl-CoA acetyltransferase 2
	Aldolase, fructose-bisphosphate A
	Pyruvate kinase, muscle
	Choline dehydrogenase
	Cytochrome b-c1 complex subunit 2,
	Cytochrome c oxidase subunit 6C

4.2.1.1 Anotación funcional de las proteínas del plasma seminal.

Mediante el software UniProtKB se pueden buscar los términos GO de las 6 proteínas de interés del plasma seminal. Respecto a la función molecular, la mayoría tienen una función catalítica o de unión, pero forman parte de diferentes procesos biológicos. En referencia a la entidad anatómica celular a la que pertenecen dichas proteínas, la mayoría son de la región extracelular, pero también existen proteínas integrales de la membrana. Es muy probable que estas proteínas del líquido seminal se deriven de los espermatozoides que han sufrido la reacción del acrosoma o apoptosis y puede estar interfiriendo con la caracterización de las proteínas liberadas por las glándulas sexuales accesorias (Jodar *et al.*, 2017).

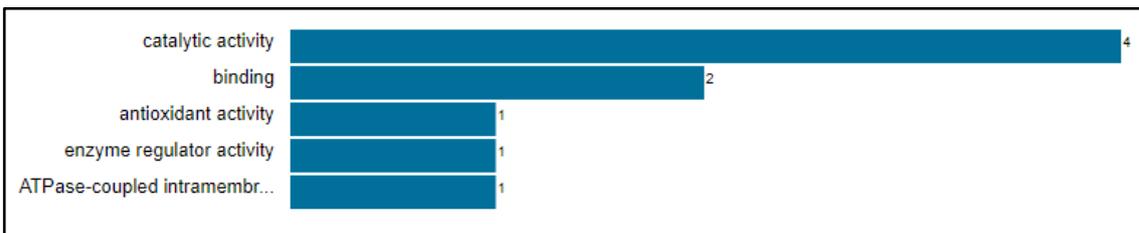


Figura 6. Gene Ontology (función molecular) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

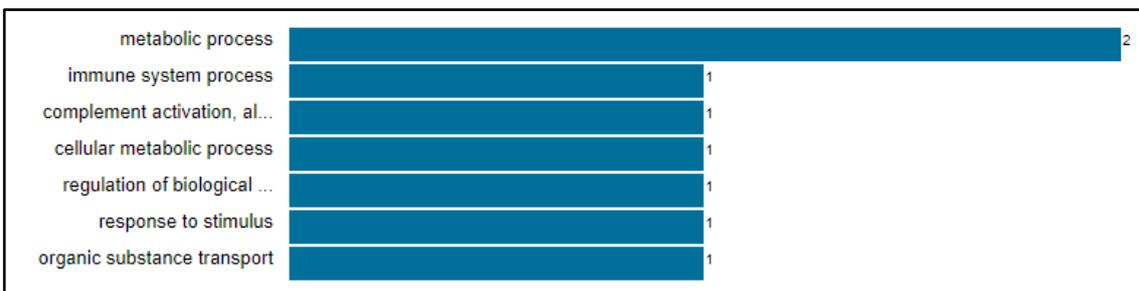


Figura 7. Gene Ontology (procesos biológicos) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

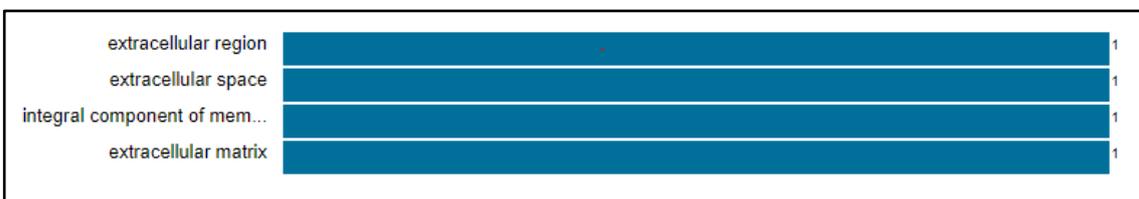


Figura 8. Gene Ontology (entidad anatómica celular) de las 6 proteínas de interés del plasma seminal extraída del UniProt.

4.2.1.2. Anotación funcional de las proteínas de la membrana de los espermatozoides

Mediante el software UniProtKB se obtienen también los términos GO de las 50 proteínas espermáticas que resultaron significativas. Respecto a la función molecular, la mayoría tienen una actividad catalítica o de unión al igual que ocurría con las proteínas del plasma seminal, y los procesos biológicos en los que participan son numerosos, aunque destaca la regulación, la localización, los procesos celulares, metabólicos y de desarrollo. En referencia al componente celular, constituyen una entidad anatómica celular o forman parte de un complejo proteico.

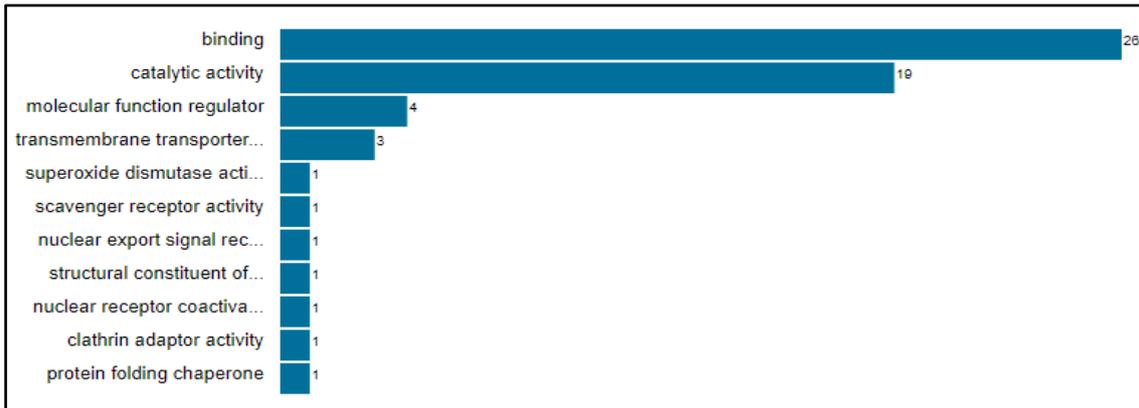


Figura 9. Gene Ontology (función molecular) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

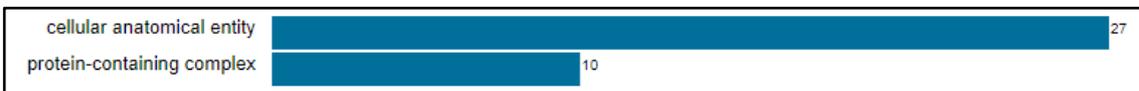


Figura 10. Gene Ontology (componente celular) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

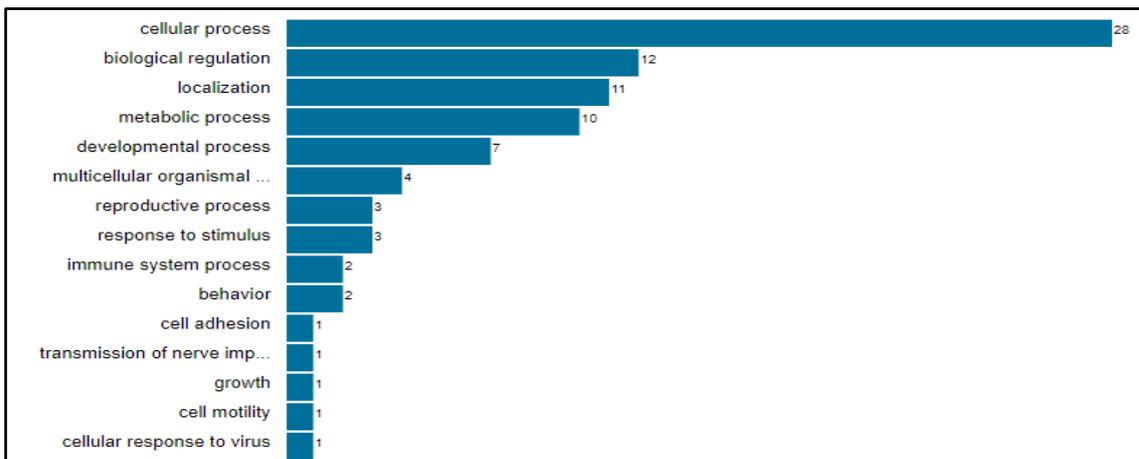


Figura 11. Gene Ontology (proceso biológico) de las 50 proteínas de interés del proteoma espermático extraída del UniProt.

4.2.2. Proteínas diferencialmente expresadas del plasma seminal

Como se ha comentado antes, en el proteoma del plasma se observaron 643 proteínas de las que solo 6 estaban diferencialmente expresadas entre ambos grupos y 3 tuvieron un Fold Change $\geq 1,2$, tal y como vemos en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. Proteínas del plasma seminal significativamente diferentes entre grupos de muestras de baja y alta fertilidad. En azul aquellas que además presentan un Fold Change (FC) $\geq 1,2$.

Group	ID	Gene name	P-value	FC
Peroxiredoxin 4	G1SMI6	PRDX4	0,0475	-0,91
Gelatinase A	Q95JA4	MMP-2	0,0182	-1,00
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	S9XK34	CB1_001633007	0,0447	1,05
Phospholipid-transporting ATPase	G1TQW3	ATP11A	0,0081	-1,33
Complement C3-like	A0A1S3WDL1	LOC103115217	0,0328	-1,23
Carboxylic ester hydrolase	G1TMC5		0,0427	1,24

Como puede observarse en la tabla 1 y en el HeatMap (Figura 4), 4 de las 6 proteínas se encontraban en mayor cantidad en las muestras de alta fertilidad, entre ellas las tres con mayor fold change absoluto (Phospholipid-transporting ATPase, Complement C3-like y Carboxylic ester hidrolase).

Phospholipid-transporting ATPase, forma parte del complejo flipasa P4-ATPasas que está relacionado con la hidrólisis de ATP para transporte de sustancias tan importantes como distintos esteroides, entre ellos el colesterol, contribuyendo además a la estabilización y mantenimiento de la asimetría de la membrana (Paulusma y Oude Elferink, 2005). Estas proteínas probablemente son segregadas en vesículas por las células epiteliales que revisten el epidídimo y glándulas anejas al aparato reproductor e incorporadas a los espermatozoides con la finalidad de estabilizar su membrana y prevenir una capacitación temprana y la reacción acrosómica (Leahy *et al.*, 2020) de ahí que también estén presentes en el proteoma de los espermatozoides (anexo 1). Por todo esto, es coherente que la expresión de esta proteína sea mayor en el plasma seminal y en los espermatozoides de las muestras de alta fertilidad.

Complement C3-like, estas proteínas están relacionadas con la capacidad inmunológica del plasma seminal y con una función protectora de los espermatozoides cuando se encuentran las vías reproductoras femeninas. La inhibición de su actividad se asocia al aumento de espermatozoides con morfología y movilidad anormales y a la infertilidad debido a que aumenta el daño y destrucción de los espermatozoides y la inflamación en el tracto reproductivo

femenino (Harris *et al.*, 2006). Esto explica que la expresión deficiente de estas proteínas esté asociada a una baja fertilidad.

Carboxylic ester hydrolase, al igual que otras hidrolasas conforman un grupo de proteínas que pueden llegar a suponer el 3% del proteoma del plasma seminal (por ejemplo, en porcino, Roca *et al.*, 2020). Algunas de estas enzimas son de origen protáctico y tienen un papel relevante durante la maduración, en la protección de los espermatozoides y en el proceso de capacitación (Mikhailov y Torrado, 2000). Ensayos realizados en ratón Knockdown sobre una enzima de esta familia CES5A ha permitido observar sus efectos sobre la capacitación y como consecuencia sobre la fertilidad. Estos resultados aparentemente entran en contradicción con los obtenidos en este trabajo, ya que en el grupo de baja fertilidad se sobreexpresa esta familia de proteínas (Zhou *et al.*, 2015).

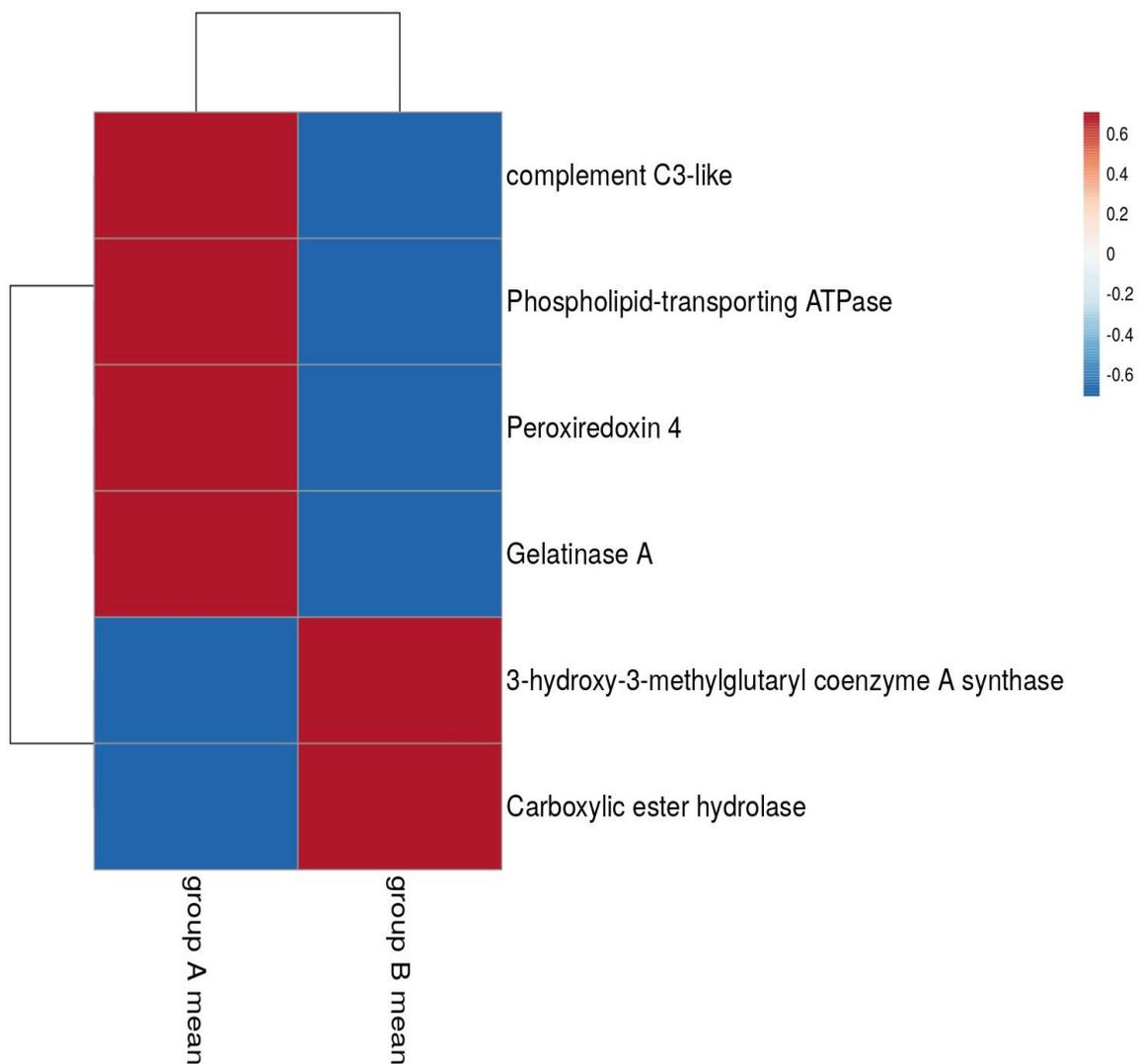


Figura 4. HeatMap de las proteínas del plasma seminal con diferencia significativa entre grupos de alta y baja fertilidad.

4.2.3. Proteínas diferencialmente expresadas en los espermatozoides.

En el proteoma espermático se analizaron 1361 proteínas de las que 50 proteínas estaban diferencialmente expresadas (anexo 1) entre ambos grupos y 9 tuvieron un Fold Change $\geq 1,2$ tal y como vemos en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Las 9 proteínas de la membrana del espermatozoide con un Fold Change (FC) $\geq 1,2$.

Protein	ID	Gene name	P-value	FC
Dynein axonemal heavy chain 2	G1TV13	DNAH2	0,0084	-1,76
G1T3K6	G1T3K6		0,0004	-3,95
Ribonuclease A H1	W0UVE4	RAH1	0,0208	1,32
Solute carrier family 30 member 9	W5PX15	SLC30A9	0,0062	-1,40
Programmed cell death 6 interacting protein	G1L717	PDCD6IP	0,0312	3,74
Histone cluster 1 H1 family member t	G1TQ05		0,0356	1,33
Protease, serine 54	G1TEZ7	PRSS54	0,0059	1,33
U3KP50	U3KP50		0,0266	1,46
Chloride intracellular channel protein	A0A1S2ZPP3	CLIC4	0,0345	2,27

Como puede observarse en la tabla 3 y en el HeatMap (Figura 5), 22 de las 50 proteínas se encontraban en mayor cantidad en las muestras de alta fertilidad, entre ellas tres de las proteínas con mayor fold change absoluto (Dynein axonemal heavy chain 2, Solute carrier family 30 member 9 y G1T3K6). Las seis proteínas restantes con un fold change $\geq 1,2$ (Chloride intracellular channel protein; Protease, serine 54; Histone cluster 1 H1 family member t; Programmed cell death 6 interacting Protein; Ribonuclease A H1 y U3KP50) forman parte de las 28 proteínas del proteoma espermático que resultaron significativamente más abundantes en las muestras de baja fertilidad.

Dynein axonemal heavy chain 2, está involucrada en la motilidad de los espermatozoides. Las dineínas son proteínas motoras que convierten la energía química contenida en el ATP en energía mecánica de movimiento. Las cadenas pesadas, son las que contienen la maquinaria motora responsable de traducir dicha energía en fuerza mecánica aplicada a la superficie de los microtúbulos (Pereira *et al.*, 2017). Esto explica que la elevada expresión de Dynein axonemal heavy chain 2 se relacione con una mejor motilidad y por tanto fertilidad de la muestra.

Solute carrier family 30 member 9, es una proteína transportadora de zinc. El zinc es muy importante en procesos como la capacitación espermática prematura o la exocitosis acrosómica exitosa. Además, se ha demostrado que el zinc es beneficioso para la fertilidad masculina (Kerns *et al.*, 2018). Este podría ser el motivo por el cual su elevada expresión se relaciona con una mayor fertilidad.

La proteína G1T3K6, pese a presentar el mayor Fold Change absoluto no ha podido relacionarse con procesos biológicos relevantes para este estudio. Ha día de hoy sigue sin estar identificada en UniProt KB (www.uniprot.org).

Histone cluster 1 H1 family member t, se requiere para una menor compactación del ADN nuclear durante la meiosis y posteriormente se reemplaza por protaminas. La presencia de estas proteínas se relaciona con anomalías nucleares que eventualmente pueden hacer que los espermatozoides sean incapaces de fertilizar o completar con éxito los pasos posteriores a la fertilización (Samanta *et al.*, 2019). Es de esperar entonces que la elevada expresión de esta proteína se correlacione con menor compactación y mayores daños sobre el ADN característico de muestras de baja fertilidad. Un ensayo de integridad del ADN (SCA o COMET, Evenson, 2016) podría verificar si existe una mayor fragmentación del ADN en las muestras de baja fertilidad como consecuencia de la mayor abundancia de esta proteína.

Chloride intracellular channel Protein funcionan en los espermatozoides como canales de cloruro o como componentes o reguladores de los canales de cloro. La presencia de tres proteínas CLIC distintas dentro de la cabeza del espermatozoide sugiere un posible papel de estas proteínas en los eventos de fertilización de gametos, como la fusión de la membrana del espermatozoide y el óvulo o la reacción del acrosoma. De hecho, se ha demostrado que un flujo de salida de iones cloruro citosólico mediado por canales de cloruro activados por ligando en la membrana plasmática es esencial para la reacción del acrosoma. Por tanto, no parece consecuente que una expresión elevada de esta proteína esté asociada a muestras de baja fertilidad (Myers *et al.*, 2004).

Las proteasas de serina parecen estar vinculadas con la maduración del espermatozoide y su capacidad de fertilización. La testisina se detecta a lo largo de la espermatogénesis y aquellos espermatozoides del epidídimo que carecen de testisina muestran una mayor tendencia a la decapitación, heterogeneidad en la forma de los espermatozoides y flagelos angulados, disminución del número de espermatozoides móviles y regulación anormal del volumen de espermatozoides (Antalis *et al.*, 2011). Algunos trabajos han señalado los inhibidores de serina proteasas se unen a la región acrosomal de la cabeza de espermatozoides y se consideran un factor decapitante ya que inhibe la incorporación de aproximadamente entre 30% y 50% del Ca^{+2} extracelular disminuyendo también los niveles de reacción acrosomal dada la inhibición de la entrada de calcio (Zalazar *et al.*, 2012). La presencia de esta familia de proteínas reducirá las posibilidades de una temprana capacitación y reacción acrosómica, lo que debería ser un efecto favorable, a priori, para la calidad de las dosis seminales, no obstante, la sobreexpresión de Protease, serine 54 se asocia a grupos de baja fertilidad por lo que podría interpretarse que los espermatozoides de estas muestras no ha podido realizar o completar su capacitación en la vías reproductoras de la hembra por el exceso de esta proteína.

Ribonuclease A H1 se asocian a la degradación del ARN (D'Alessio *et al.*, 2001). Se trata de una endonucleasa que degrada específicamente el ARN de los híbridos ARN-ADN y desempeña un papel clave en la replicación y reparación del ADN (GeneCards, 2017). Esta proteína no ha sido relacionada con una función específica en espermatozoides. Existe un estudio en ratón que asocia la pérdida de RNase H1 con la letalidad embrionaria (Tannous *et al.*, 2015) y otro estudio con espermatozoides humanos, que concluye que a medida que avanza la maduración espermática la abundancia de esta proteína es menor. Por tanto, su sobreexpresión estaría

indicando inmadurez (Samanta *et al.*, 2019) Esto último, concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, que asocian su elevada expresión con una baja fertilidad.

Programmed cell death 6 interacting protein es una proteína multifuncional involucrada en endocitosis, biogénesis corporal multivesicular, reparación de membranas, citocinesis, apoptosis y mantenimiento de la integridad de la unión estrecha. Los estudios que utilizan células de ratón han demostrado que la sobreexpresión de esta proteína puede bloquear la apoptosis (GeneCards, 2017). No se conoce su papel específico en los espermatozoides, en este trabajo su abundancia está asociada a la infertilidad, probablemente, al igual que ocurría con las proteasas de serina, la estabilización o la reducción de estos mecanismos afectan a los procesos de capacitación y reacción acrosómica que, en parte, pueden ser considerados como el inicio de procesos apoptótico. Una vez completada la capacitación, el espermatozoide puede interactuar con la cubierta del óvulo, atravesarla y fusionar su membrana. Si no ocurre, el espermatozoide capacitado proseguirá un proceso de muerte celular.

La proteína **U3KP50** al igual que ocurría con G1T3K6 sigue sin estar identificada en UniProt KB (www.uniprot.org) y, por tanto, no existe aún ningún artículo que hable sobre su efecto en la fertilidad

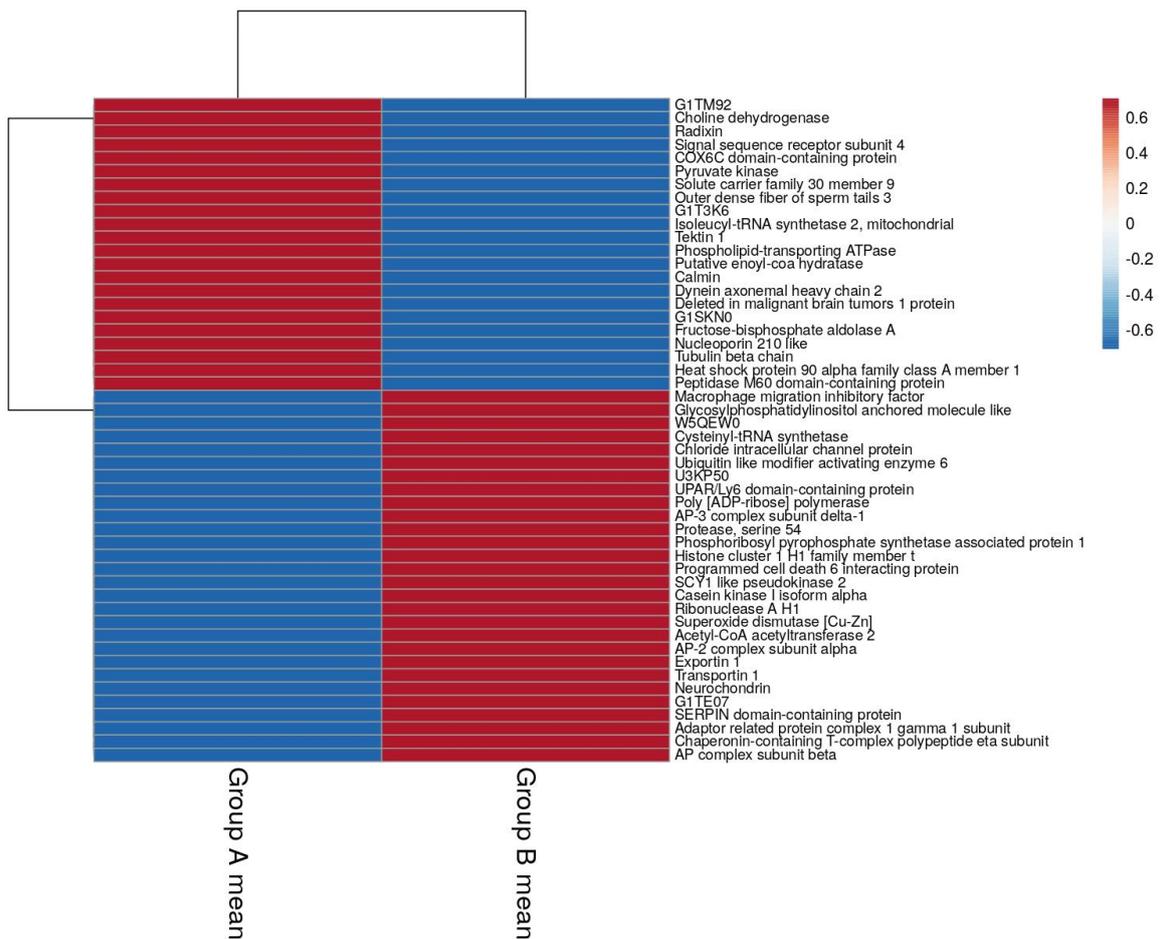


Figura 5. HeatMap de las proteínas espermáticas con diferencia significativa entre grupos de alta y baja fertilidad.

5. Conclusión

En conclusión, tras el análisis estadístico de los proteomas del esperma y del plasma seminal de las 643 y 1361 proteínas anotadas solo 6 y 50 resultaron diferencialmente expresadas (la mayoría de estas proteínas están relacionadas con actividades catalíticas y de unión). Dentro de las proteínas diferencialmente expresadas, destacaron por tener un FC $\geq 1,2$ un total de 12 proteínas relacionadas con la función de los espermatozoides y que podrían ser candidatas a biomarcadores seminales.

De entre estas 12 proteínas, es conveniente reseñar Phospholipid-transporting ATPase, que está en mayor abundancia tanto en el plasma seminal como en los espermatozoides en las muestras de alta fertilidad y que está relacionada con la estabilización de la membrana y la prevención de la capacitación temprana. Y, además, dos proteínas con una elevada sobreexpresión en las muestras de alta fertilidad, Programmed cell death 6 interacting protein, asociada a procesos como la reparación de membranas y la apoptosis celular, y la proteína G1T3K6, aunque ésta sigue sin estar identificada.

En un siguiente ensayo deberían identificarse, al menos, el nivel expresión de estas proteínas en eyaculados y machos con la finalidad de establecer si su sobreexpresión o su baja expresión depende de condiciones ambientales, nutricionales o de estimulación o, si es una característica asociada al genotipo de los machos. Además de confirmar su relación con la fertilidad realizando inseminaciones a partir de eyaculados o machos de modo individualizado.

6. Bibliografía

- Antalis, T. M., Bugge, T. H., & Wu, Q. (2011). Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Progress in molecular biology and translational science*, 99, 1–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385504-6.00001-4>
- Aviles, K.G. (2011). Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides Epididimarios y Eyaculados en la especie porcina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Bezerra, M., Arruda-Alencar, J. M., Martins, J., Viana, A., Viana Neto, A. M., Rêgo, J., Oliveira, R. V., Lobo, M., Moreira, A., Moreira, R. A., & Moura, A. A. (2019). Major seminal plasma proteome of rabbits and associations with sperm quality. *Theriogenology*, 128, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.013>
- Casares-Crespo, L., Fernández-Serrano, P., & Viudes-de-Castro, M. P. (2019). Proteomic characterization of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) sperm from two different genotypes. *Theriogenology*, 128, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.026>
- Castellini, C. (1996). Recent advances in rabbit artificial insemination. In: *Proceeding of 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, Vol. 2*, pp. 13–26.
- D'Alessio, G., Di Donato, A., Piccoli, R., & Russo, N. (2001). Seminal ribonuclease: preparation of natural and recombinant enzyme, quaternary isoforms, isoenzymes, monomeric forms; assay for selective cytotoxicity of the enzyme. *Methods in enzymology*, 341, 248–263. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)41156-6](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)41156-6)
- Database, G. H. G. (2017). GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search. Gen RNASEH1. <https://www.genecards.org>
- Druart, X., & de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal reproduction science*, 194, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.061>
- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., & de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, 137, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.034>
- Evenson D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA (®)) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal reproduction science*, 169, 56–75.

- Farrell, P. B., Foote, R. H., Simkin, M. E., Clegg, E. D., & Wall, R. J. (1993). Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *Journal of andrology*, 14(6), 464–471.
- Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et biophysica acta*, 1469(3), 197–235. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(00)00018-6)
- García, M. J., Felices, U. A., Povedano, C. M. & Romero, G. J., MA, (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen: Manual analítico y técnico de ayuda al diagnóstico de la esterilidad y subfertilidad de origen para las técnicas de reproducción asistida. Omniascience. <https://doi.org/10.3926/oss.5/>
- Harris, C. L., Mizuno, M., & Morgan, B. P. (2006). Complement and complement regulators in the male reproductive system. *Molecular Immunology*, 43(1–2), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.06.026>
- Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>
- Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Jeyendran, R. S., van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Jodar, M., Soler-Ventura, A., Oliva, R., & Molecular Biology of Reproduction and Development Research Group (2017). Semen proteomics and male infertility. *Journal of proteomics*, 162, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>
- Juárez, J. D., Marco-Jiménez, F., Talaván, A. M., García-Domínguez, X., Viudes-de-Castro, M. P., Lavara, R., & Vicente, J. S. (2020). Evaluation by re-derivation of a paternal line after 18 generations on seminal traits, proteome and fertility. *Livestock Science*, 232, 103894.
- Jung, M., Rüdiger, K., & Schulze, M. (2015). In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50 Suppl 2, 20–24. <https://doi.org/10.1111/rda.12533>

- Kerns, K., Zigo, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4097. <https://doi.org/10.3390/ijms19124097>
- Leahy, T., Rickard, J. P., Pini, T., Gadella, B. M., & Graaf, S. P. (2020). Quantitative Proteomic Analysis of Seminal Plasma, Sperm Membrane Proteins, and Seminal Extracellular Vesicles Suggests Vesicular Mechanisms Aid in the Removal and Addition of Proteins to the Ram Sperm Membrane. *PROTEOMICS*, 20(12), 1900289. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900289>
- Machorro-Ramírez, Luis Ángel, Alba-Quiróz, Leticia, Paredes-Guiñán, Otto José, Monsalve-Flores, Carlos, Valdez-Morales, Francisco Javier, & Valdés-Carrillo, Arturo. (2018). Evaluación de la integridad del ADN espermático y su repercusión en los parámetros seminales de varones infértiles. *Ginecología y obstetricia de México*, 86(11), 699-708. Epub 02 de octubre de 2020. <https://doi.org/10.24245/gom.v86i11.1844>
- Mejía-Villanueva, O., Ramos-Contla, D., Rivera-Rebolledo, J., Ordáz-López, R., & Palma-Irizarry, M. (2008). Congelación de semen de borregos Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) obtenido mediante electroeyaculación o post-mortem. En Sánchez, A., Hidalgo-Mihart, M., Arriaga-Weiss, S., & Contreras-Sánchez WM (eds). *Perspectivas en Zoología Mexicana* (p. 205-215). Fondo Editorial.
- Metsalu, T., & Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W566-W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>
- Mikhailov, A. T., & Torrado, M. (2000). Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 5, E53–E62. <https://doi.org/10.2741/mikhail>
- Myers, K., Somanath, P. R., Berryman, M., & Vijayaraghavan, S. (2004). Identification of chloride intracellular channel proteins in spermatozoa. *FEBS Letters*, 566(1–3), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.017>
- Organización Mundial de la Salud. (2001). *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*, 4a ed. Editorial Médica Panamericana.
- Paulusma, C., & Oude Elferink, R. (2005). The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1741(1–2), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.04.006>

- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian journal of andrology*, 19(1), 5–14. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
- Pizzagalli, M. D., Bensimon, A., & Superti-Furga, G. (2021). A guide to plasma membrane solute carrier proteins. *The FEBS journal*, 288(9), 2784–2835. <https://doi.org/10.1111/febs.15531>
- Roca, J., Perez-Patiño, C., Barranco, I., Padilla, L. C., Martínez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., & Parrilla, I. (2020). Proteomics in fresh and preserved pig semen: Recent achievements and future challenges. *Theriogenology*, 150, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.066>
- Rodríguez A, Santos J, Ibarra AK, Barragán JA. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*, 1a ed. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rodríguez-Martínez H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 38(4), 312–318. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x>
- Samanta, L., Sharma, R., Cui, Z., & Agarwal, A. (2019). Proteomic analysis reveals dysregulated cell signaling in ejaculated spermatozoa from infertile men. *Asian journal of andrology*, 21(2), 121–130. https://doi.org/10.4103/aja.aja_56_18
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., & Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>
- Sutovsky, P., Aarabi, M., Miranda-Vizueté, A., & Oko, R. (2015). Negative biomarker based male fertility evaluation: Sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. *Asian journal of andrology*, 17(4), 554–560. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153847>
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., ... Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques*, 34(2), 374–378. <https://doi.org/10.2144/03342mt01>

- Tannous, E., Kanaya, E., & Kanaya, S. (2015). Role of RNase H1 in DNA repair: removal of single ribonucleotide misincorporated into DNA in collaboration with RNase H2. *Scientific reports*, 5, 9969. <https://doi.org/10.1038/srep09969>
- Theau-Clément, M., Galliot, P., Souchet, C., Bignon, L., & Fortun-Lamothe, L. (2016). Adaptive capacity of female rabbits submitted to a change in breeding practices. *World Rabbit Science*, 24(4), 267. <https://doi.org/10.4995/wrs.2016.5155>
- Viudes-de-Castro, M., & Vicente, J. (1997). Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Animal Reproduction Science*, 46(3–4), 313–319. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(96\)01628-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(96)01628-4)
- Viudes-de-Castro, M., Mocé, E., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., & Vicente, J. (2014). Aminopeptidase activity in seminal plasma and effect of dilution rate on rabbit reproductive performance after insemination with an extender supplemented with buserelin acetate. *Theriogenology*, 81(9), 1223–1228. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.003>
- World Health Organization. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (Fifth edition)*. World Health Organization.
- Zalazar, L., Clementi, M.A., Fornés, M.W., & Cesari, A. (2012). Búsqueda de inhibidores de serina proteasas en glándulas accesorias del sistema reproductor masculino. *Reproducción*, 27, 79-88.
- Zhou, Y. C., Zhang, Y. L., Ru, Y. F., Xue, H. M., Ni, Z. M., & Xia, D. (2015). An epididymis-specific carboxyl esterase CES5A is required for sperm capacitation and male fertility in the rat. *Asian Journal of Andrology*, 17(2), 292. <https://doi.org/10.4103/1008-682x.143314>

7. Anexos

ANEXO 1. Proteínas de los espermatozoides significativamente diferentes entre grupos de muestras de baja y alta fertilidad. En azul aquellas que además presentan un Fold Change (FC) $\geq 1,2$. En rojo aquellas que se encuentran diferencialmente expresadas también en el plasma seminal.

Protein	ID	Gene name	p-value	FC
Heat shock protein 90 alpha family class A member 1	H0UXJ8	HSP90AA1	0,0335	-0,82
G1SF28	G1SF28		0,0312	-0,27
Tubulin beta chain	Q8IZ29	TUBB2C	0,0323	-0,60
Nucleoporin 210 like	G1T214	NUP210L	0,0479	-0,53
Fructose-bisphosphate aldolase A	P00883	ALDOA	0,0424	-0,45
Chaperonin-containing T-complex polypeptide eta subunit	B6V9S8		0,0066	0,55
AP complex subunit beta	M3YPP7	AP1B1	0,0075	0,44
G1SKN0	G1SKN0		0,0474	-0,36
G1T5J0	G1T5J0		0,0486	-0,82
Dynein axonemal heavy chain 2	G1TV13	DNAH2	0,0084	-1,76
Adaptor related protein complex 1 gamma 1 subunit	W5P100	AP1G1	0,0319	0,38
G1U822	G1U822		0,0312	1,19
G1TE07	G1TE07		0,0162	0,50
Neurochondrin	G1T4X0	NCDN	0,0297	1,03
Calmin	G1T054	CLMN	0,0487	-0,80
Transportin 1	G1T568	TNPO1	0,0412	0,62
Exportin 1	W5QG19	XPO1	0,0231	0,41
AP-2 complex subunit alpha	U3F8W6	AP2A2	0,0142	0,48
Putative enoyl-coa hydratase	K9IIU7		0,0228	-0,36
G1T678	G1T678	ACAT2	0,0299	0,83
Phospholipid-transporting ATPase	G1TVK5		0,0414	-0,54
Tektin 1	G1U264	TEKT1	0,0310	-0,50
Isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	G1S293	IARS2	0,0449	-0,93
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	G1TKH3	SOD1	0,0196	0,86
G1T3K6	G1T3K6		0,0004	-3,95
Outer dense fiber of sperm tails 3	G1T7H5	ODF3	0,0194	-0,72
Ribonuclease A H1	W0UVE4	RAH1	0,0208	1,32
Casein kinase I isoform alpha	W5P5Y5	LOC114108773	0,0304	0,41
Solute carrier family 30 member 9	W5PX15	SLC30A9	0,0062	-1,40
SCY1 like pseudokinase 2	W5PW22	SCYL2	0,0155	0,44
Pyruvate kinase	G1SQD3	PKM	0,0370	-0,73
Programmed cell death 6 interacting protein	G1L717	PDCD6IP	0,0312	3,74
Histone cluster 1 H1 family member t	G1TQ05		0,0356	1,33

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase associated protein 1	W5PC18	PRPSAP1	0,0324	0,56
Protease, serine 54	G1TEZ7	PRSS54	0,0059	1,33
AP-3 complex subunit delta-1	G5BBC0	GW7_07318	0,0452	0,27
Poly [ADP-ribose] polymerase	U3KN58		0,0314	0,85
G1TPV7	G1TPV7		0,0441	-1,13
G1U593	G1U593		0,0088	0,47
U3KP50	U3KP50		0,0266	1,47
Ubiquitin like modifier activating enzyme 6	G1T466	UBA6	0,0055	0,39
Chloride intracellular channel protein	A0A1S2ZPP3	CLIC4	0,0345	2,27
Cysteinyl-tRNA synthetase	G1SWD9		0,0399	1,18
W5QEW0	W5QEW0	LOC101103542	0,0471	0,88
Signal sequence receptor subunit 4	M3W1G5	SSR4	0,0237	-1,17
Glycosylphosphatidylinositol anchored molecule like	G1T8J1	GML	0,0489	0,60
Radixin	M3XW52	RDX	0,0149	-0,29
Choline dehydrogenase	G1SWH6	CHDH	0,0374	-0,71
G1TM92	G1TM92		0,0431	-0,44