



**TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETERMINAR LA CALIDAD SEMINAL DEL
BOVINO SOMETIDO A CRIOTOLERANCIA: INFORME DE PASANTÍA DE
INVESTIGACIÓN**

FABIAN MATIAS PACHECO MARTINEZ

**UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POPAYÁN**

2022

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETERMINAR LA CALIDAD SEMINAL DEL
BOVINO SOMETIDO A CRIOTOLERANCIA: INFORME DE PASANTÍA DE
INVESTIGACIÓN**

FABIÁN MATÍAS PACHECO MARTÍNEZ

Director (a):

CARMEN ALICIA DAZA BOLAÑOS

MÉDICO VETERINARIO MSc, PhD

Líneas de investigación:

BIENESTAR Y SALUD ANIMAL

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

POPAYÁN

2022

PÁGINA DE ACEPTACIÓN



Director
Carmen Alicia Daza Bolaños



Jurado
Juan Pablo Andrade

Dedicatoria

Este informe se lo dedico a la facultad de Medicina de la Universidad Antonio Nariño con sede en la ciudad de Popayán la cual hizo posible mi viaje a la ciudad de Girona en el laboratorio Tecno Sperm de la Universidad de Girona para realizar pruebas moleculares las cuales nos van a determinar la fertilidad de los bovinos en las diferentes producciones en las cuales esté implicado el macho.

Tabla de Contenido

	Pág
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Justificación	11
Entidad o Institución	12
Objetivos	13
General	13
Específicos	13
Estado del arte	14
Citometría de flujo	15
Western blot	15
PCR en tiempo real	16
Resultados	17
Citometría de flujo	17
Western blot	19
PCR en tiempo real	20
Conclusiones y recomendaciones	24

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia de biomarcadores	Pág 22
Tabla 2. Preparación de la curva de la recta patrón y Tampón de lisis	27

Lista de figuras

Figura 1. Receta patrón	Pág 21
-------------------------	-----------

Resumen

El estudio de la identificación de los biomarcadores que estén vinculados con la calidad seminal del toro, son muy importantes al momento de cuantificar proteínas y células espermáticas que determinen la fertilidad del macho bovino.

Por tal motivo se realizó una pasantía investigativa en el laboratorio Tecno Sperm con el ánimo de adquirir un entrenamiento en las técnicas para evaluar la calidad seminal del macho bovino a partir de la citometría de flujo, western blot y PCR en tiempo real, como técnicas convencionales que se realizan en los laboratorios que tienen como fin determinar los biomarcadores presentes en la fertilidad del ganado bovino.

Una vez aplicadas las técnicas se pudo observar que son muy eficaces y precisas para evaluar la viabilidad del semen a partir de las diferentes alteraciones que se originan al momento de someter los espermatozoides al estrés térmico durante el proceso congelación. El almacenamiento hipotérmico del semen del bovino permite su criopreservación sin antibióticos, pero este proceso está limitado a la alta sensibilidad que tiene los espermatozoides al momento de su congelación.

Palabras claves: Citometría de flujo, western blot, PCR en tiempo real, viabilidad, calidad de semen, células espermáticas.

Abstract

The study of the identification of biomarkers that are linked to the seminal quality of the bull, are very important when quantifying proteins and sperm cells that determine the fertility of the bovine male.

For this reason, a research internship was carried out in the Tecno Sperm laboratory with the aim of acquiring training in the techniques to evaluate the seminal quality of bovine males from flow cytometry, western blot and real-time PCR, as conventional techniques. That are carried out in laboratories whose purpose is to determine the biomarkers present in the fertility of cattle.

Once the techniques were applied, it was observed that they are very effective and precise to evaluate the viability of the semen from the different alterations that originate when the sperm are subjected to thermal stress during the freezing process.

The hypothermic storage of bovine semen allows its cryopreservation without antibiotics, but this process is limited by the high sensitivity of sperm at the time of freezing.

Keywords: Flow cytometry, western blot, real-time PCR, viability, semen quality, sperm cells.

Introducción

La importancia de poder determinar la fertilidad de un toro en cualquier tipo de producción ganadera es fundamental para que esta sea eficiente, rentable y sostenible. En Colombia se necesita identificar los toros de baja fertilidad para evitar pérdidas económicas incalculables, aunque los toros reproductores producen miles de millones de espermatozoides en su mayoría con motilidad y morfología normales, algunos toros sufren de baja fertilidad debido a defectos moleculares o celulares en sus espermatozoides los cuales son identificados hasta el momento de su colecta (Memili et al., 2020).

Es de resaltar que en campo se realiza pruebas tradicionales como el análisis en la motilidad, volumen y la concentración para determinar cuántos espermatozoides produce un toro por mililitros, por tal motivo el laboratorio Tecno Sperm ha dedicado esfuerzos para hacer pruebas más especializadas que identifiquen biomarcadores para certificar la calidad seminal. Este laboratorio es de referencia a nivel de Europa por llevar una trayectoria en la reproducción asistida desde 1987 y está integrado por un grupo de Investigación reconocido internacionalmente y está dotado de una infraestructura científica de punta en el campo de la biotecnología reproductiva, la biología celular y la biología molecular como:

La técnica del western blot se utilizó para comprobar si se ha producido una transferencia uniforme del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa y se hacen comparaciones de los niveles de expresión de proteínas naturales o desnaturalizadas entre muestras y son separadas por electroforesis en gel para luego ser transferidas a una nueva membrana de unión de proteínas, para identificar una proteína objetivo; la cual es detectada por un anticuerpo específico (Meftahi, 2021)

La PCR cuantitativa es la expresión en cadena de la polimerasa por medio de mi-RNA, el cual es un monocatenario cuya capacidad está orientada a la regulación de la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de la ribointerferencia que está presente en los fluidos corporales en un estrecho contacto con células germinales como los espermatozoides (Radtke et al., 2019).

Tecno Sperm utiliza para el desarrollo de la PCR en tiempo real los mi-ARN TaqMan® del laboratorio Thermo Fisher Scientific los cuales son un conjunto de cebadores y sondas preformulados (fragmentos cortos de ADN monocatenario utilizados para determinadas técnicas de laboratorio), que están diseñados para el análisis de niveles de expresión de micro -ARN utilizados en una PCR en tiempo real de Applied Biosystems™ en miARN maduros que están presentes en el ARN total de la siguiente forma:

- 1) Extendiendo del extremo 3' de la transcripción madura mediante la adición de polimerasa.
- 2) Luego alargando el extremo 5' mediante la ligadura del adaptador

Por todas las cualidades que posee Tecno Sperm se decide hacer la pasantía investigativa para aprender y fortalecer lo relacionado con la calidad seminal para identificar en Colombia los factores que puedan alterar los porcentajes de preñez.

.

Justificación

Se elige a Tecno Sperm como centro de investigación por su trayectoria y calidad de artículos que aporta a la ciencia y el entrenamiento que desarrolla en el pasante sobre el manejo de los diferentes equipos; lo cual genera una oportunidad no solamente en el conocimiento de la reproducción, sino que forja un carácter y objetivos a corto, mediano y largo plazo como investigador. La pasantía en Tecno Sperm se convierte en una formación integral que proyecta al futuro investigador a un refuerzo o transformación de los conocimientos adquiridos durante su formación, permitiéndole al estudiante que comprenda para dónde va la ciencia con respecto al estudio de las diferentes alteraciones que se presenta en la reproducción animal. El objetivo principal es poner en práctica todo lo aprendido en esta pasantía para aplicar todos los conocimientos concernientes a la fisiopatología de la reproducción y todos los factores que conlleven a la alteración en la calidad seminal en la búsqueda de mejorar los porcentajes de preñez.

Entidad o Institución

TechnoSperm es un Centro de investigación, innovación y transferencia en biotecnología de la reproducción porcina con sede en el Parque científico y tecnológico de la Universidad de Girona España; centrando su actividad en el ámbito de la biotecnología de la reproducción animal y humana. Su objetivo es poder extender sus actividades investigativas a otros animales domésticos como équidos bovinos, ovinos, cánidos y felinos. Dentro de sus objetivos está ofrecer un servicio de calidad que involucre la investigación en el porcino desde el punto de vista científico con eficacia y eficiencia en su cumplimiento.

También quiere extender e intensificar cualitativamente y cuantitativamente la colaboración con todas las empresas del sector porcino nacional estatal y del resto de Europa. Mejorando constantemente las competencias del Centro a partir del hecho de asegurar una formación e instalaciones científicas que estén a la vanguardia del conocimiento.

Tecnho Sperm cuenta con una dirección, una subdirección y la áreas de reproducción asistía, criopreservación del semen, biología molecular y el área de apoyo.

Objetivos

General

Aprender técnicas moleculares para determinar biomarcadores que estén vinculados con calidad seminal del bovino al momento de la criotolerancia.

Específicos

Realizar la extracción de la Glutación S-transferasas Mu 3 (GSTM3) de los espermatozoides de bovino como biomarcador de la fertilidad.

Realizar citometría de flujo a nivel espermático del bovino para determinar la implicación de la función mitocondrial, motilidad y viabilidad durante su vida útil.

Realizar PCR en tiempo real para identificar mi-ARN que intervenga en la calidad espermática

Estado del arte

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica basada en la utilización de la luz láser, en el recuento y la clasificación de células según sus características morfológicas, para determinar la presencia de biomarcadores y proteínas con una mayor sensibilidad y especificidad en la calidad seminal de los mamíferos (Llavanera et al., 2019). Respecto a la utilización de la citometría de flujo para evaluar la viabilidad espermática del macho bovino, tiene mayor ventaja sobre la microscopía de fluorescencia por su mayor objetividad, reproducibilidad y sensibilidad debido a que son suspensiones de fluidos monocelulares naturales que proporcionan una mayor precisión. Teniendo en cuenta que la citometría de flujo nos permite evaluar los espermatozoides de la mayoría de las especies (Boe-Hansen & Satake, 2019).

En el año 2021 el departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad Estatal de Colorado, EE. UU, realiza una evaluación de la capacitación espermática de toros cuya muestra de semen fueron donadas al Programa Nacional de Germoplasma Animal de sementales comerciales, alimentados con una ración completa de heno para satisfacer todas las necesidades nutricionales y con suministro de agua ad libitum. Durante la realización de ensayos con citometría de flujo permitió una comprensión más sólida de todos los procesos de capacitación de la calidad y función del esperma, acompañados de la capacidad de monitorear muchos aspectos de la fisiología del esperma, incluido la señalización intracelular (Purdy et al., 2021)

No obstante, es bien conocido que, para la evaluación de los espermatozoides, la citometría de flujo tiene mayor sensibilidad, permitiendo la realización de un sin número de

medidas en un lapso de tiempo más corto, acompañado de una evaluación más simple y simultánea dentro de una serie de parámetros espermáticos.

Western blot

Western blot es una técnica biológica que se hace mediante una electroforesis que consiste en la separación de moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Utilizando una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. En esta técnica se va a identificar la Glutación S-transferasas Mu 3 (GSTM3), la cual es una enzima antioxidante esencial que intervienen en la protección celular contra el estrés oxidativo, preservando la función mitocondrial, mantenimiento la estabilidad de la membrana y la capacidad de fertilización. Recientemente, se ha establecido el triple papel de las GSTM3 de los espermatozoides, que participan en la desintoxicación celular, la regulación en la señalización celular y los eventos de unión entre el espermatozoides con la zona pelúcida del óvulo; siendo la GSTM3 uno de los factores que determinar la subfertilidad o infertilidad idiopática de los machos bovinos, recientemente propuesto como biomarcador de la calidad, fertilidad y criotolerancia de los espermatozoides (Llavanera et al., 2020).

Las proteínas son biomoléculas funcionales y estructurales de las cuales más del 80% de ellas no operan solas sino en forma de complejos. La técnica de biología molecular Western blot es utilizada para identificar proteínas presentes en el plasma seminal de forma directa o in vitro, se utilizan proteínas que no son anticuerpos para sondear las proteínas de interés en la transferencia. Si la proteína transferida interactúa con la sonda, las manchas se visualizan en la membrana (Meftahi, 2021).

PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto del ácido desoxirribonucleico en los espermatozoides con alteraciones seminales que exhiben un diferencial en sus mi-ARN; lo cual proporciona nuevas evidencia del papel que juega los mi-ARN en la espermatogonia determinando el potencial fértil de los espermatozoides según su carga genética y epigenética en los mamíferos (Salas-Huetos et al., 2015).

Se cree que las transcripciones de microARN en los espermatozoides del toro están relacionadas con su rendimiento reproductivo, por tal motivo se plantea la hipótesis que las variaciones en el estado de la fertilidad de los toros tienen asociaciones estadísticas con las diferencias en los niveles de ciertos miARN presentes en los espermatozoides eyaculados y que pueden estar asociados con la apoptosis (Menezes et al., 2020)

Resultados

Citometría de flujo

El laboratorio Tecno Sperm ha desarrollado un protocolo donde emplea una serie de fluorocromos (Sustancia que se emplea para marcar anticuerpos u otras moléculas, por su propiedad de emitir luz de una determinada longitud de onda, cuando se le estimula con un láser o con luz ultravioleta), por dos investigadores para poder determinar alguna alteración que puedan sufrir los espermatozoides a nivel morfológicos.

El protocolo utilizado por laboratorio Tecno Sperm para realizar prueba de citometría de flujo emplea los siguientes fluorocromos:

SYBR-14(100 μ M), viabilidad de los espermatozoides

HE YO-PRO-1(25 μ M), superóxidos

JC1 (300 μ M), la actividad mitocondrial

PNA (1mg/ml)- PI (2.4mM), la integridad de su acrosoma

M540 (1mM)/YO-PRO-1 (25 μ M), la estabilidad de su membrana

H2DCFDA (200mM)- DMSO-PI (2.4mM), los peróxidos

FLUO3 (1mM)/PI (204mM), calcio intracelular

Este protocolo tiene como fin establecer la permeabilidad de la membrana y los diferentes daños que puedan ocurrir a nivel del acrosoma y la función mitocondrial del espermatozoide del bovino con el paso del tiempo.

Para poder llevar a cabo este experimento se solicitan 7 dosis de distintos machos para cada réplica se utiliza tubos falcon de 50 μ l con 35 μ l de semen.

Se rotula 24 tubos falcons según los grupos que quedando de la siguiente manera **C(1),Y0.5(2),Y0.2(3),Y0.1(4),Y0.05(5)** respectivamente y el número de la réplica **R1,R2,R3,R4,R5,R6.**

Continuando con la dilución del inhibidor YM-1(sol.Stock 100mM) a 1mM: **20µL YM-1+180 µL PBS** añadiendo el inhibidor en la concentraciones **0,0.5, 0.2, 0.1, 0.05 µM** según la tabla para su posterior incubación de 30 minutos mínimo a 17° antes de tomar las muestra del día o (TO).

Al momento de realizar la citometría se toma una medición cada día (TO; T2, T4, T8, T10, T14); y se continúa con la preparación de los fluorocromos según la plantilla en tubos falcon de 15ml y cogiendo 0,2 mL de la muestra de semen para ser diluido en 50x10⁶: 134µL de PBS+66µL del semen y se procede a añadir en cada pocillo 190 µL de la mezcla del fluorocromo-PBS y 10 µL de semen con la pipeta multicanal y se graba el experimento con fecha y parámetros según la plantilla de lectura.

Durante el experimento se mide la motilidad de los espermatozoides cada día (TO, T2, T4, T8, T10, T14) para capturar parámetros de motilidad a través de la técnica casa de cada grupo experimental (C, Y0.5, Y0.2, Y0.1, Y0, 05); teniendo en cuenta el tiempo de incubación y el número de la réplica.

Complementariamente a la citometría de flujo se realiza análisis por proteómica

Donde en esta técnica se hace una fijación en paraformaldehído al 4% de las proteínas que están en la cromatina y se realizan posteriormente estudios en los cambios de histona por protaminas (P1 y P2); en esta técnica se debe asegurar de tener los portaobjetos remojados con etanol al 100%, sacándolos del medio que se encuentra, se continúa diluyendo 250 µL de la

muestra con 750 μ L de PBS1X en un micro tubo Eppendorf de 2ml y se procede a centrifugar a 500g por 5 minutos, después de los 5 minutos se elimina el sobrenadante y resuspendiendo con 400 μ L de paraformaldehído al 4% dejándolo incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Mientras se incuba la muestra procedemos a roturar los portaobjetos según el grupo experimental y la réplica que se esté realizando.

Después de tiempo de incubación se debe centrifugar a 500g durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo con 800 μ L de PBS1X, se vuelve a centrifugar a 500g durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo con 800 μ L de PBS1X. Se añade 150 μ L de la muestra a cada portaobjeto y esparcir la muestra por la parte no opaca. Se deja sedimentar durante 2 horas y después se debe congelar los portaobjetos a -20°C .

Durante la práctica investigativa en Techno Sperm se realizó la técnica para poder medir niveles de ATP/AMPC/WB. Para llevar a cabo la técnica se toma las muestras en tubos Falcons de 15 ml centrifugándola a 600g durante 5 minutos, se continúa en retirar el sobrenadante y resuspendiendo en 1mL de PBS y ponerlo en un epp, para centrifugar a 600g durante 5 minutos y posteriormente quitar el sobrenadante y congelar el pallets a -80°C . Es de aclarar que los tubos deben estar rotulados con el grupo experimental y tiempo de incubación.

Western blot.

Como se mencionó anteriormente en el western blot se evalúa la presencia de la enzima GSTM3 como biomarcador de fertilidad en la especie bovina. Para mayor entendimiento mirar los anexos donde se explica paso a paso el desarrolla la técnica.

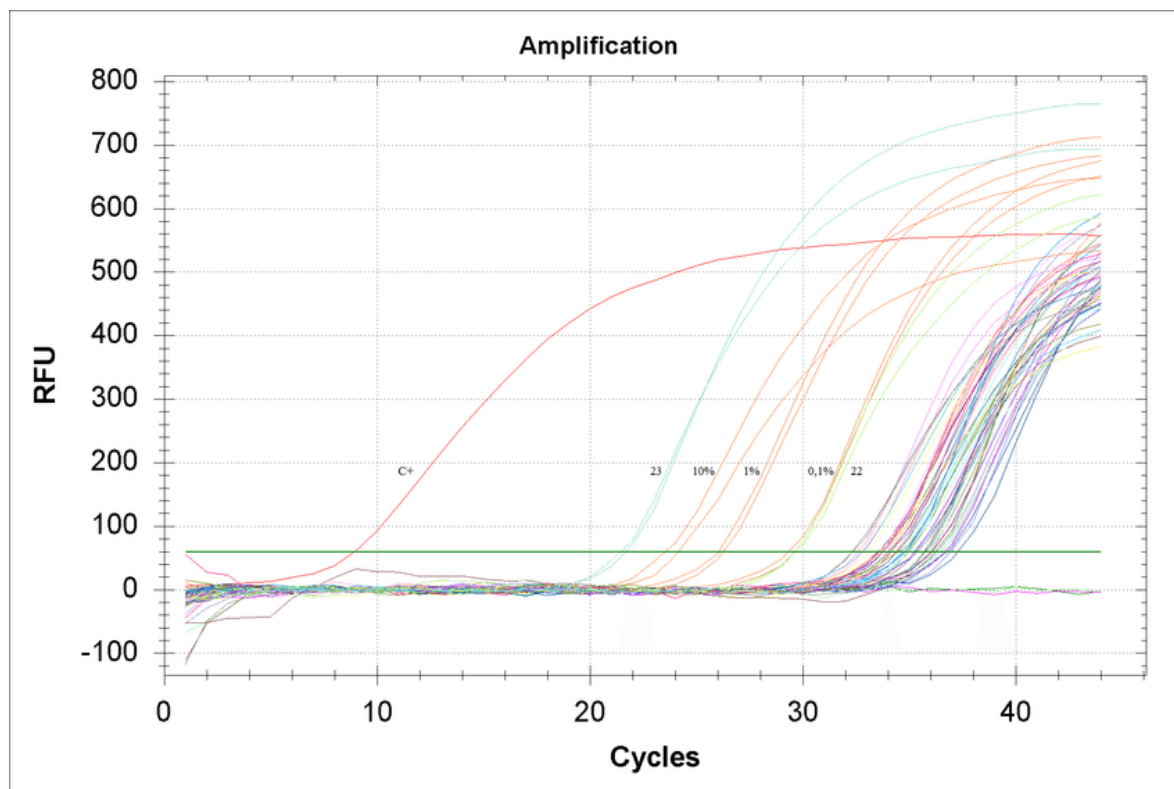
PCR en tiempo real (qPCR)

Como se explicó con anterioridad existe una clara evidencia de la presencia de microARN en los fluidos relacionados con el esperma en el plasma seminal y durante la eyaculación. Por tal motivo resulta como alternativa la qPCR puede detectar las expresiones de estos micrones que determinan los biomarcadores relacionados con la espermatogénia, determinando el potencial fértil de los espermatozoides según su carga genética.

La acumulación de fluorescencia durante la prueba está relacionada directamente con el número inicial de copias de ADN; en los diferentes ensayos por medio de los fluorocromos se detectan la reacción en cadena de la polimerasa. Por tal razón en los diferentes ensayos donde se pudo identificar los miARNs en una PCR en tiempo real puede determinar los biomarcadores de calidad seminal del ganado bovino. En la siguiente imagen el espectro de emisión de los fluorocromos comúnmente usados en la PCR en tiempo real, se observan la emisión de diversos fluorocromos con diferentes longitudes de onda. Las letras representan las longitudes de onda empleadas por diferentes filtros para detectar el grupo de fluorocromos. Los fluorocromos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluorocromos con afinidad por el ADN y, b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN

Figura número 1

Fragmentos de ADN emitido por medio de fluorocromos amplificados en el tiempo

**Fuente:**

Curvas de amplificación del promotor NTC bta-miR-146b^a azul claro mediante PCR en tiempo real. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación supera el umbral (línea horizontal de color verde), donde es mayor la cantidad inicial de ADN

Tabla número 1
Secuencia de micrones

Samples 1-3/4-6/7-9/10-12/13-15/16-18/19-21/22-24/25-27/28-29												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC cel- miR- 39-3p	NTC bta- miR- 10a	NTC bta- miR- 10b	NTC bta- miR- 138	NTC bta- miR- 146b	NTC bta- miR- 19b	NTC bta- miR- 26a	NTC bta- miR- 34a	NTC bta- miR- 449a	NTC bta- miR- 495	NTC bta- miR-7	S1 cel- miR- 39-3p
B	S1 cel- miR- 39-3p	S1 bta- miR- 10a	S1 bta- miR- 10a	S1 bta- miR- 10b	S1 bta- miR- 10b	S1 bta- miR- 138	S1 bta- miR- 138	S1 bta- miR- 146b	S1 bta- miR- 146b	S1 bta- miR- 19b	S1 bta- miR- 19b	S1 bta- miR- 26a
C	S1 bta- miR- 26a	S1 bta- miR- 34a	S1 bta- miR- 34a	S1 bta- miR- 449a	S1 bta- miR- 449a	S1 bta- miR- 495	S1 bta- miR- 495	S1 bta- miR-7	S1 bta- miR-7	S2 cel- miR- 39-3p	S2 cel- miR- 39-3p	S2 bta- miR- 10a
D	S2 bta- miR- 10a	S2 bta- miR- 10b	S2 bta- miR- 10b	S2 bta- miR- 138	S2 bta- miR- 138	S2 bta- miR- 146b	S2 bta- miR- 146b	S2 bta- miR- 19b	S2 bta- miR- 19b	S2 bta- miR- 26a	S2 bta- miR- 26a	S2 bta- miR- 34a
E	S2 bta- miR- 34a	S2 bta- miR- 449a	S2 bta- miR- 449a	S2 bta- miR- 495	S2 bta- miR- 495	S2 bta- miR-7	S2 bta- miR-7	S3 cel- miR- 39-3p	S3 cel- miR- 39-3p	S3 bta- miR- 10a	S3 bta- miR- 10a	S3 bta- miR- 10b
F	S3 bta- miR- 10b	S3 bta- miR- 138	S3 bta- miR- 138	S3 bta- miR- 146b	S3 bta- miR- 146b	S3 bta- miR- 19b	S3 bta- miR- 19b	S3 bta- miR- 26a	S3 bta- miR- 26a	S3 bta- miR- 34a	S3 bta- miR- 34a	S3 bta- miR- 449a
G	S3 bta- miR- 449a	S3 bta- miR- 495	S3 bta- miR- 495	S3 bta- miR-7	S3 bta- miR-7							
H												

Fuente: Albert Salas Huetos

Cumplimiento de objetivos

Durante la pasantía investigativa en el laboratorio Tecno Sperm se cumplió con los objetivos propuesto porque se llevó a la práctica las técnicas que permiten desglosar todos los interrogantes que existían con respecto a las diferentes alteraciones que se presentan en la reproducción de los mamíferos, partiendo desde el espermatozoide. Además se pudo identificar que los bovinos pueden presentar alteraciones en su calidad espermática desde su alimentación.

El aporte que dejó esta pasantía es un mayor interés por lo científico desde el desarrollo de pruebas moleculares que determine los problemas que están presentes en la reproducción en todas las especies del interés productivo. Dentro de los limitantes fue el inglés para poder comprender con mayor claridad todos los estudios que están vinculados en el análisis de los espermatozoides y no tener un perfil de biólogo.

Conclusiones y Recomendaciones

El benéfico que trae aplicar estas técnicas es que podemos determinar algún tipo de alteración que comprometa la calidad espermática en los toros, bajo unos parámetros moleculares que involucren la morfología espermática. De hecho, en una muestra de semen una gran parte de los espermatozoides pueden presentar alguna alteración morfológica.

Desafortunadamente en Colombia no se cuenta con muchos equipos que realicen citometría de flujo (cytoFLEX), por los altos costos de sus reactivos; lo cual ha conllevado a que no exista la cultura en los grandes criadores de toros reproductores la realización de estudios como la citometría de flujo y la PCR en tiempo real. El objetivo es culturizar a pequeños y grandes productores sobre la necesidad de entregar machos comprobados y para ello sería necesario realizar pruebas como Western blot que nos pueda determinar la calidad espermática; asegurando en un aceptable porcentaje de la fertilidad de los toros que salen a cubrir hembras en potreros o aquellos que son sometidos a la colecta.

Bibliografía

- Boe-Hansen, G. B., & Satake, N. (2019). An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, *137*, 93–103.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.043>
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Fernández-Fuertes, B., Recuero, S., Mateo, Y., Bonet, S., Barranco, I., & Yeste, M. (2019). GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0370-5>
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Mateo-Otero, Y., Padilla, L., Romeu, X., Roca, J., Barranco, I., & Yeste, M. (2020). Exploring seminal plasma GSTM3 as a quality and in vivo fertility biomarker in pigs—relationship with sperm morphology. *Antioxidants*, *9*(8), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/antiox9080741>
- Meftahi, G. H. (2021). *Applications of western blot technique : From bench to bedside*. March, 1–9. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- Memili, E., Moura, A. A., & Kaya, A. (2020). Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science*, March, 106355.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106355>
- Menezes, E. S. B., Badial, P. R., El Debaky, H., Husna, A. U., Ugur, M. R., Kaya, A., Topper, E., Bulla, C., Grant, K. E., Bolden-Tiller, O., Moura, A. A., & Memili, E. (2020). Sperm miR-15a and miR-29b are associated with bull fertility. *Andrologia*, *52*(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1111/and.13412>
- Purdy, P. H., Graham, J. K., & Azevedo, H. C. (2021). Evaluation of boar and bull sperm capacitation and the acrosome reaction using flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 106846. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106846>
- Radtke, A., Dieckmann, K., Grobelny, F., Salzbrunn, A., & Oing, C. (2019). *Expression of miRNA-371a-3p in seminal plasma and ejaculate is associated with sperm concentration*. 469–474. <https://doi.org/10.1111/andr.12664>
- Salas-Huetos, A., Blanco, J., Vidal, F., Godo, A., Grossmann, M., Pons, M. C., F-Fernández, S., Garrido, N., & Anton, E. (2015). Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertility and Sterility*, *104*(3), 591–601.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.06.015>

Anexos

Parte 1. Extracción Proteica:

Permite la recuperación eficiente de proteínas y elimina los componentes no proteicos, polisacáridos, lípidos y compuestos fenólicos.

Como preparar el tampón de lisis (ripa) (y 50mL por 24 muestras)

1. Descongelar las muestras en hielo.
2. Voltar y añadir 100-400µl de TAMPÓN DE LISI en las muestras
3. Incubar 45min en hielo, y bordear cada 5 minutos.
4. Centrifugar a 14.000g a 4°C durante 20min.
5. Recoger el sobrenadante en Eppendorfs siliconados
6. Conservar el sobrenadante a -80°C para cuantificación

Parte 2. Cuantificación de Proteínas:

Se cuantifica las proteínas separadas que son transferidas del gel a la superficie de la membrana.

PREPARACIÓN DE MATERIAL

1. Descongelar las muestras en hielo
2. Preparar los reactivos

BSA 2mg/ml en hielo: Nevera Lab 3 (caja verde BIO-RAD dentro de un recipiente azul que dice WESTERN).

Kit BIO-RAD DC Protein Assay: Armario Gris.

Poner el REACTIVO B en un Falcon de 50 mL.

Preparar la SOLUCIÓN A' en diferentes Eppendorf en una gradería en función del número de muestras 20µl Regente S + 1mL Regente A

Preparar la curva de la recta patrón a partir de BSA 2mg/ml y TAMPÓN DE LISI En 6 Eppendorfs diferentes (del n°2 al n°7 para que la primera y la última se prepararan directamente en la cubeta.

Se hace una recta patrón que trata de una curva construida con cantidades ya establecidas por el laboratorio Tecno Sperm

Tabla 1

STANDARD	VOLUMEN BASAL	VOLUMEN DEL TAPON LISI	CONCENTRACION FINAL $\mu\text{g/ml}$	VOLUMEN FINAL(μL)
1	100(20)	0	2000	100
2	75	25	1500	100
3	50	50	1000	100
4	37.5	62.5	750	100
5	50	150	500	200
6	50 de standard 5	50	250	100
7	25 de standard 5	75	125	100
8	0	100(20)	0	100

Fuente: Laboratorio Tecno Sperm

4. Preparar la placa de 96 pozetes:

- Añadir 5 μl de cada Standard por duplicado (1-8) y 2 primeras columnas.
- Añadir 5 μl de cada muestra (1-8) y a partir de la 3^a columna.
- Añadir 25 μl de la SOLUCIÓN A' en todas las muestras y standards
- Añadir 200 μl de REACTIVO B a todas las muestras y standards

5. Incubar 15 minutos (máximo 1h) en la oscuridad a temperatura ambiente

6. Leer la placa en el espectrofotómetro a 750 nm.

7. Guardar los datos en el excel.

8. Hacer la recta patrón y comprobar que presenta una $r^2 > 0,99$

9. Comprobar que la absorbancia de muestras entre dentro del rango de la recta patrón.

10. Extrapolar la concentración de cada muestra.

Dilución de la Muestra

Diluir cada muestra madre con el TAMPÓN DE LISI en Eppendorfs de 1,5ml siliconados siempre en hielo y conservar las muestras diluidas y las muestras madre a -80°

Parte 3. Electroforesis (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método se basa en una corriente eléctrica y un tampón de transferencia para llevar las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello, se apilan en el orden descrito los siguientes elementos (del polo negativo o ánodo al positivo o cátodo): esponja, varios papeles de filtro empapados en *tampón* de transferencia, gel, membrana, más papeles de filtro empapados y otra esponja.

REPARACIÓN DE MUESTRAS POR LA ELECTROFORESIS

1. Preparar las muestras de carga:

- a. Preparar las muestras en una gradería con hielo
- b. Preparar Eppendorfs de 1,5mL siliconados según el número de muestras que tengamos (vigilar si tenemos distintos anticuerpos).
- c. Preparar el TAMPÓN DE CARGA LR 4X (Laemmli Reductor 4X). Añadir 100 μ L de BME por cada 900 μ L de LR.
- d. Preparar las muestras:

Voltear y añadir 10 μ L de muestra

Añadir 10 μ L de TAMPÓN DE CARGA LR 4X

- e. Mezclar con la micropipeta (NO VORTEAR)

Se puede conservar a -80°C (si es necesario)

Electroforesis

1. Quitar los geles de poliacrilamida de la nevera y templar 5 minutos.
2. Preparar el TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 1X desde el 10X

100ml de tampón 10X + 900ml de miliQ

3. Llenar la cubeta de electroforesis con el TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 1X, entre los dos geles y dentro de la cubeta.
4. Calentar ladder All Blue y las muestras a 95°C durante 5 minutos.
5. Centrifugar las muestras de 3 en 3 (NO VORTEAR)
6. Cargar las muestras con la micropipeta. En el pozo 1 va el marcador All Blue, y en el resto las muestras.
7. Poner el tapón de la cubeta de electroforesis con los electrodos en la posición correcto.
8. Hacer correr el hiel con un voltaje de 150V (60-80 min).
9. Detener la fuente cuando el marcador azul LR llegue abajo de todo en todos los hielos
(Si uno de los geles va más lento, hay que esperar a que acabe aunque en los otros geles salga el marcador azul LR por debajo. Si sale por debajo no se puede reutilizar el TAMPÓN DE ELECTROFORESIS).

Parte 4. Transferencia (Transblot Turbo).

Transblot Turbo es un sistema de transferencia de proteínas es una herramienta poderosa en el flujo de trabajo de transferencia Western, que permite la visualización e identificación de proteínas para el análisis posterior.

Preparar el TAMPÓN DE TRANSFERENCIA (150mL cada 2 membranas)

1. Activar las membranas de PVDF

- a. Recipiente metanol: 10 segundos en metanol puro (remándola)
- b. Recipiente miliQ: Enjuagar con agua miliQ hasta que se hunda c. Recipiente con 30mL de TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X: dejar Equilibrante 2-3 minutos
2. Equilibrar las hojas de depósito iónico (separadas por hojas azules)
 - a. Cumplimentar el recipiente con 50ml de TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X
 - b. Dejar impregnar la hoja de depósito iónico inferior 2-3 minutos. c. Dejar impregnar la hoja de depósito iónico superior 2-3 minutos
3. Montar el sándwich en la base del cajón del transblot.
 - a. Hoja de depósito iónico inferior y. Pasar el rodillo para retirar burbujas.
 - b. Membrana PVDF. Se pueden colocar de diferentes formas según la Cantidad de membranas que se tengan.
 - c. Hielo. Si hay dos, colocar la base de los dos geles en el centro y Pasar El rodillo para retirar burbujas
 - d. Hoja de depósito iónico superior y. Pasar el rodillo para retirar burbujas.
5. Colocar la tapa del cajón e introducir la caja en el Transblot 6. Iniciar el programa: a. Abrir el Transblot (botón del lado derecho) b. Select Protocolo y List c. Bio-Rad
 - e. 1 MINI gel o 2 MINI/1 MIDI, según el número de membranas e. StandardSD y Run
 - f. Seleccionar el cajón A (superior) y/o el B (inferior), e iniciar la transferencia (30 minutos)
4. Retirar la tapa del cajón, recuperando las membranas. Tirar el resto a Citotóxicos y limpiar el cajón con agua destilada.

Cuantificación de la Proteína total

1. Limpiar bien el vidrio de SynGene con etanol 70%.
2. Colocar la membrana en SynGene, mojado con tampón de transferencia.
3. Exponer con UV: Programa “GeneSys” y Hielo y StainFree gel y 5 min.
4. Volver a remojar la membrana con tampón de transferencia.
5. Capturar proteína total: y Blot y StainFree blot 6. Guardar la fotografía en formato del programa y formato tif.

Parte 5. Bloqueo

Es una solución para que bloquee las membranas, placas y otras muestras con esta solución al 5 % de leche en polvo desnatada lista para usar con inmunotransferencia (Western blot), ELISA y otros métodos de detección.

1. Preparar el TAMPÓN DE BLOQUEO.
2. Poner 25ml de TAMPÓN DE BLOQUEO en cada caja.
3. Dejar a temperatura ambiente en agitación 1 hora, o dejar a 4°C en agitación *overnight*.
4. Recuperar el TAMPÓN DE BLOQUEO dentro de la misma botella. Se pueden añadir unas gotas de *Thimerasa 1%* y guardar hasta 1 semana.

Parte 6. Anticuerpo primario es utilizado para la unión de un anticuerpo primario con la proteína buscada.

Preparar en un Falcon la dilución del anticuerpo primario correspondiente según el experimento, teniendo en cuenta el número de membranas (10 ml por membrana), y sortear. GSTM3 1:10.000 (4 membranas – 40mL): 4µl AbI en 40mL bloqueo

1. Añadir 10ml de ANTIGUOSO a cada caja de membranas.
2. Dejar a temperatura ambiente en agitación 1 hora, o dejar a 4°C en agitación *overnight*.

3. Recuperamos el anticuerpo primario dentro del mismo halcón y poner 1-2 gotas de conservante *Thimerasa 1%*. Se guarda 1 mes a 4°C.
4. 3 lavados de 5 minutos con TBS Tween20 1X
5. Colocar 50 mL de TBS Tween20 1X en cada caja de membranas y dejar a temperatura ambiente en agitación 5 minutos.
6. Lanzar el TBS al contener de debajo de la campana y repetir el proceso.

Parte 7. Anticuerpo secundario

Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se expone al anticuerpo secundario. Este reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario.

Preparar en un halcón la dilución del anticuerpo secundario según el experimento, teniendo en cuenta el número de membranas (10ml por membrana), y bordear. (Importante comprobar si el anticuerpo primario es de Rabbit o Mouse)

GSTM3 Anti-Rabbit 1:20.000 (4 membranas – 40mL): 2 μ l AbI en 40mL bloqueo

1. Añadir 10ml de PREPARACIÓN ANTIGUO II a cada caja de membranas.
2. Dejar a temperatura ambiente en agitación 1 hora.
3. NO se recupera el anticuerpo secundario (tirarlo)
4. 5 lavados de 5 minutos con TBS Tween20 1X
5. Colocar 50 mL de TBS Tween20 1X en cada caja de membranas y dejar a temperatura ambiente en agitación 5 minutos.
6. Lanzar el TBS al contener de debajo de la campana y repetir el proceso

Parte 8. Revelado

Revelar con el kit “*IMMOBILION WESTERN chemiluminiscente HRP substrate*” (Lab 3

– nevera). Dejar templar 20 minutos en TA.

Preparar la SOLUCIÓN DE REVELADO (para 4 membranas) 12 mL solución I + 12 mL solución II

Cortar tantos plásticos como membranas tengamos

Retirar el TBS Tween20 1X de la caja de membranas

Voltear la SOLUCIÓN DE REVELADO

Añadir 6ml de la SOLUCIÓN DEREVELADO y dejar agitando durante 5 minutos.

Colocar la membrana en el plástico transparente y quitar burbujas frotando con un papel

Revelar en SynGene