

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



**CALIDAD SEMINAL Y EXPRESIÓN DE ARNm *PLCZI* EN**

**CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOROS CRIOLLO**

**CHIHUAHUENSE *vs* EUROPEO**

**POR:**

**M. V. Z. LUIS MIGUEL RONQUILLO ROACHO**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA  
EN REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ANIMAL**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**AGOSTO DE 2021**



Calidad seminal y expresión de ARNM PLCZ1 en células espermáticas de toros criollo chihuahuense vs europeo. Tesis presentada por Luis Miguel Ronquillo Roacho como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

---

Ph.D. Carlos Ortega Ochoa  
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

---

D.Ph. Agustín Corral Luna  
Secretario de Investigación y Posgrado

---

Ph.D. Iván Adrián García Galicia  
Coordinador Académico

---

Dr. José Alfredo Martínez Quintana  
Presidente

31 Agosto 2021

---

Fecha

Comité:  
Dr. Francisco Joel Jahuey Martínez  
Ph.D. Felipe Alonso Rodríguez  
Almeida  
M.C. Javier Antillón Ruiz

© Derechos Reservados  
AUTOR: LUIS MIGUEL  
RONQUILLO ROACHO  
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO  
FRANCISCO R. ALMADA  
KM.1, CHIHUAHUA, CHIH.,  
MÉXICO C.P. 31453  
AGOSTO 2021

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por haberme brindado vida y salud para poder culminar con éxito la Maestría en Producción Animal, uno de los logros más importantes en mi vida.

A mi familia, por todos los sacrificios, consejos y apoyo incondicional para poder culminar con éxito mis estudios de posgrado.

Al Dr. José Alfredo Martínez Quintana por permitirme formar parte de una de sus investigaciones y por su valiosa enseñanza, paciencia y tiempo brindados para poder culminar con el presente trabajo.

Al M. C. José Octavio Roacho Estrada y trabajadores del Rancho Experimental Teseachic por ayudar con la disponibilidad y manejo de los animales.

Al M. C. Javier Antillón Ruiz por la disponibilidad y apoyo en el trabajo de campo.

Al Centro de Biotecnología y Reproducción de la UGRCH, por el apoyo brindado para realizar parte de este proyecto en sus instalaciones.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio y posgrado de la FZyE, por todo el apoyo, consejos y tiempo que pasamos durante mi estancia dentro del programa de Maestría en Ciencias en Producción animal.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 954781 que me brindó para el financiamiento de mis estudios de Maestría, y a la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua por la excelente formación recibida.

## DEDICATORIA

A mis padres, por todo el amor, apoyo, confianza y sacrificios brindados durante estos años. Muchos de mis logros, entre los que se incluye éste, se los debo a ustedes.

A mi padre, el Sr. José Miguel Ronquillo Leyva, por ser parte fundamental de mi formación, por sus consejos, confianza y apoyo incondicional brindado.

A mi madre, la Sra. María Magdalena Roacho Estrada, por ser uno de los pilares más importantes en mi educación, por ese cariño, consejos, sacrificios y apoyo brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos Néstor Jesús, Joaquín, José Esteban, Estrella de Jesús, Lucero Isabel y Luna Socorro Ronquillo Roacho, gracias por su amor y consejos, los cuales han contribuido en la conclusión de esta nueva etapa de mi vida.

A Estefani López Regalado por su gran amor, y apoyo incondicional para lograr culminar esta gran etapa de mi vida.

## **CURRICULUM VITAE**

El autor nació el 6 de febrero de 1995 en la ciudad de Hidalgo del Parral, Chihuahua, México.

2010-2013      Estudios de nivel medio superior como Técnico Administrador en el Colegio de Bachilleres del estado de Durango plantel 07, Villa Ocampo, Dgo.

2013-2018      Estudios de licenciatura en la Universidad Juárez del Estado de Durango, egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con el título de Médico Veterinario Zootecnista. Titulado por modalidad EGEL.

## RESUMEN

### CALIDAD SEMINAL Y EXPRESIÓN DE ARNm *PLCZ1* EN CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE TOROS CRIOLLO CHIHUAHUENSE vs EUROPEO

POR:

M. V. Z. LUIS MIGUEL RONQUILLO ROACHO

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Dr. José Alfredo Martínez Quintana

Los análisis de motilidad y cinemática espermática son importantes para predecir la fertilidad del toro; sin embargo, existen otras moléculas dentro del espermatozoide con la capacidad de mejorar el porcentaje de preñez. Por ejemplo, *PLCZ1* es una proteína presente en el espermatozoide que desempeña un papel único en la activación del cigoto y es importante en la sobrevivencia del embrión, asegurando llegar a término con la gestación. Además, se ha reportado que existe una relación positiva entre los niveles de proteína *PLCZ1* y los niveles de su ARNm. El objetivo de este estudio fue evaluar la motilidad y cinemática seminal, así como determinar la expresión de ARNm *PLCZ1* en células espermáticas de toros Criollo chihuahuense y Europeo, bajo condiciones de producción con bajos insumos. El estudio se realizó en dos etapas que corresponden a experimentos independientes. En la etapa 1 se caracterizó la motilidad y cinemática del semen refrigerado y posdescongelado en cuatro toros Criollo y cuatro Angus. Con dos eyaculados por toro espaciados por cinco días.

En la etapa 2 se evaluó la motilidad masal e individual, así como la expresión de ARNm *PLCZ1* en las células espermáticas de tres toros Criollo y tres Europeos en dos épocas del año (invierno y verano); de cada toro se colectaron tres eyaculados con intervalos de cinco días para cada época. Los análisis estadísticos en la Etapa 1 se realizaron con el PROC MIXED de SAS, teniendo como factores fijos la raza y estado de semen (refrigerado y posdescongelado) y como efecto aleatorio al toro. No se encontraron diferencias por grupo racial en motilidad ni cinemática espermática. La motilidad total fue mayor ( $P < 0.05$ ) en semen refrigerado comparado con posdescongelado ( $54.4 \pm 5.9$  vs  $32.3 \pm 5.9$  %). En cinemática espermática se encontró una diferencia ( $P < 0.05$ ) en variables de velocidad como: VAP y VCL, así como en: DCL, STR, LIN, ALH y WOB por estado del semen. Los análisis estadísticos para la Etapa 2 se realizaron con el PROC GLM de SAS, teniendo como factores fijos la raza y época del año. No se encontraron diferencias en la motilidad individual por grupo racial ni época, sin embargo, la motilidad grupal fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el ganado Europeo durante el invierno ( $76.6 \pm 2.8$  vs  $71.1 \pm 2.8$  %) y esta diferencia fue más pronunciada durante el verano ( $77.7 \pm 2.8$  vs  $58.88 \pm 2.8$  %), teniendo un efecto de interacción. La expresión relativa a  $\beta$ -actina de ARNm *PLCZ1* fue 5.3 veces mayor ( $P < 0.05$ ) en el invierno ( $5.09 \pm 1.09$ ) con respecto al verano ( $0.96 \pm 1.09$ ). Se observó una tendencia ( $P = 0.12$ ) a ser mayor los niveles de ARNm *PLCZ1* en ganado Criollo con respecto al Europeo ( $4.36 \pm 1.09$  vs  $1.69 \pm 1.09$ ). Se concluye que el análisis molecular del semen adicional a los indicadores de una prueba de fertilidad, es importante, ya que, con valores de motilidad similares, los toros pueden presentar diferentes niveles de expresión de ARNm *PLCZ1*.

## ABSTRACT

### SEMINAL QUALITY AND EXPRESSION OF *PLCZ1* mRNA IN SPERM CELLS OF CHIHUAHUENSE CRIOLLO BULLS VS EUROPEAN

by:

M. V. Z. LUIS MIGUEL RONQUILLO ROACHO

Sperm motility and kinematics analyzes are important to predict bull fertility; however, there are other molecules in the sperm with the ability to improve the pregnancy rate. For example, PLCZ1 is a protein from sperm that plays a unique role in the activation of the zygote and is important in the survival of the embryo, ensuring that the gestation reaches term. Furthermore, it has been reported that there is a positive relationship between the levels of the PLCZ1 protein and the levels of its mRNA. The aim of the study was to evaluate seminal motility, sperm kinematics and determine the expression of *PLCZ1* mRNA in sperm cells of Chihuahuense Criollo bulls and European bulls, under low-input production conditions. The study was carried out in two stages that correspond to independent experiments. In stage 1, the motility and kinematics of the refrigerated and post-thawed semen were characterized in four Criollo and four Angus bulls. With two ejaculates per bull every five days. In stage 2, mass and individual motility was evaluated, as well as the expression of *PLCZ1* mRNA in the sperm cells of three Criollo and three European bulls at two seasons of the year (winter and summer); from each bull, three ejaculates were collected at intervals of five days for each season. The statistical analyzes in Stage 1 were carried out with the PROC MIXED of SAS, having as fixed factors the breed and



state of semen (refrigerated and post-thawed) and as a random effect to the bull. No differences were found by racial group in motility or sperm kinematics. Total motility was higher ( $P < 0.05$ ) in refrigerated semen compared to post-thaw ( $54.4 \pm 5.9$  vs  $32.3 \pm 5.9$  %). In sperm kinematics, a difference ( $P < 0.05$ ) was found in speed variables such as: VAP and VCL, as well as in: DCL, STR, LIN, ALH and WOB by state of the semen. Statistical analyzes for Stage 2 were performed with the PROC GLM of SAS, having race and season as fixed factors. No differences were found in individual motility by racial group or season, however, group motility was higher ( $P < 0.05$ ) in European cattle during winter ( $76.6 \pm 2.8$  vs  $71.1 \pm 2.8$  %) and this difference was more pronounced during the summer ( $77.7 \pm 2.8$  vs  $58.88 \pm 2.8$  %), having an interaction effect. The expression of *PLCZ1* mRNA, relative to  $\beta$ -actin was 5.3 times higher ( $P < 0.05$ ) in winter ( $5.09 \pm 1.09$ ) compared to summer ( $0.96 \pm 1.09$ ). A tendency ( $P = 0.12$ ) is projected to be higher the levels of *PLCZ1* mRNA in Creole cattle with respect to the European one ( $4.36 \pm 1.09$  vs  $1.69 \pm 1.09$ ). It is concluded that the molecular analysis of semen in addition to the indicators of a fertility test is important, since, with similar motility values, bulls can present different levels of expression of *PLCZ1* mRNA.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	xii
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
<b>Generalidades del Bovino Criollo Chihuahuense</b> .....	4
<b>Comportamiento del Criollo en Sistemas Semiáridos</b> .....	6
<b>Características Reproductivas del Ganado Criollo Chihuahuense</b> ....	8
<b>Análisis Seminal Tradicional y Molecular en Bovinos</b> .....	10
<b>El ARN en el Espermatozoide</b> .....	11
<b>El Papel del ARN Espermático</b> .....	13
<b>PLCZ</b> .....	14
<b>Efecto de la Nutrigenómica en los Espermatozoides</b> .....	18
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>Área de Estudio</b> .....	20
<b>Etapa 1</b> .....	21
<b>Descripción de los animales.</b> .....	21
<b>Recolección y evaluación seminal.</b> .....	21
<b>Análisis macroscópico y microscópico.</b> .....	21
<b>Análisis de calidad seminal con software CASA</b> .....	22
<b>Etapa 2</b> .....	23

<b>Descripción de los animales.</b> .....	23
<b>Recolección y evaluación seminal.</b> .....	23
<b>Análisis macroscópico y microscópico.</b> .....	24
<b>Purificación de células espermáticas.</b> .....	24
<b>Extracción de ARN y síntesis de ADNc.</b> .....	25
<b>Control de calidad del ARN espermático.</b> .....	25
<b>Diseño de oligonucleótidos para qPCR.</b> .....	26
<b>Cuantificación de transcritos del gen <i>PLCZ1</i>.</b> .....	27
<b>Análisis Estadístico</b> .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>Etapa 1</b> .....	29
<b>Motilidad total y progresiva.</b> .....	29
<b>Cinemática espermática.</b> .....	31
<b>Etapa 2</b> .....	34
<b>Motilidad individual y grupal.</b> .....	34
<b>Expresión de <i>PLCZ1</i>.</b> .....	37
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	444
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	455

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Medias $\pm$ error estándar para el porcentaje de motilidad total y progresiva en semen bovino refrigerado y semen posdescongelado.....	30
2	Medias $\pm$ error estándar de características cinemáticas en semen de toros Criollo Chihuahuense y Angus, refrigerado y posdescongelado obtenidos mediante el análisis espermático asistido por computadora (CASA).....	32
3	Medias $\pm$ error estándar de la motilidad individual y grupal del semen de bovinos Criollo y Europeo en invierno y verano.....	36

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Porcentaje de Motilidad Grupal en la interacción raza por época.....	37
2	Expresión del ARNm <i>PLCZ1</i> en la interacción raza por época.....	40
3	Expresión de ARNm <i>PLCZ1</i> por épocas.....	41
4	Expresión de ARNm <i>PLCZ1</i> por grupo racial.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura espermática y contenido transferido al ovocito en la fertilización.....	13
2	Representación esquemática de la activación del óvulo desencadenada por PLCZ1 específica de espermatozoide.....	16

## INTRODUCCIÓN

EL ganado Criollo chihuahuense es uno de los 33 biotipos que existen en el continente americano (De Alba-Martínez, 2011). Este ganado es reconocido por su resistencia al calor y su longevidad, teniendo una adaptabilidad de más de 400 años en América incluidas las regiones del norte de México y sur de EU (Salazar y Cardozo, 1981; De Alba-Martínez, 2011). La supervivencia de este ganado ha dependido siempre de la disponibilidad de forrajes que se encuentran en el agostadero, sin algún manejo reproductivo o sanitario, lo que dio como resultado animales con una gran adaptación a ambientes en los cuales otras razas no pueden sobrevivir (De la Torre, 1981; Salazar y Cardozo, 1981; Russell *et al.*, 2000). El ganado Criollo tiende a ramonear vegetación arbórea y arbustivas, consumir frutos y una diversidad de plantas herbáceas y gramíneas que el ganado especializado no consume. Este comportamiento, disminuye el impacto sobre el ecosistema del pastizal, por lo que se le ha llamado “Ganado Ecológico” (Fierro y Pamanes, 1998; Peinetti *et al.*, 2011; Pauler *et al.*, 2019). El tipo de dieta que consumen los animales tiene como consecuencia una modificación en la expresión génica en diferentes tejidos y células incluidos los espermatozoides (Du *et al.*, 2014; Venkata Krishnaiah *et al.*, 2019).

Los sementales Criollo Chihuahuense presentan buena calidad seminal durante todo el año (Quezada-Casasola *et al.*, 2016); sin embargo, el conocimiento de la buena calidad seminal con las pruebas de fertilidad convencionales, no asegura la viabilidad del embrión (Quintero-Moreno *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2020). En los últimos años, el análisis de calidad seminal y

de la fertilidad ha tenido un importante progreso. Dicho progreso va de los parámetros visuales y morfológicos convencionales del semen a enfoques bioquímicos y fisiológicos de evaluación de calidad seminal para lograr una preñez exitosa (Boerke *et al.*, 2007; Atabay *et al.*, 2019; Venkata Krishnaiah *et al.*, 2019; Franco *et al.*, 2020).

Recientemente, se reportó que al incluir análisis de biomarcadores moleculares como: metabolitos, enzimas y ARNs de los espermatozoides eyaculados, permitirá la eficiente selección de sementales que garanticen la mejora en la tasa de preñez (Barratt *et al.*, 2011). Existe una gran variedad de ARNs en los espermatozoides (ARN mensajero, ARN de transferencia y ARN no codificante) que tienen un efecto en la sobrevivencia del embrión (Boerke *et al.*, 2007); de los cuales se han reportado varios ARNs en células espermáticas de bovino, algunos de los más importantes son los ARN mensajeros, dentro de los cuales *PLCZ* es de gran importancia (Boerke *et al.*, 2007). El inicio de una serie de oscilaciones de calcio intracelular dentro del ovocito es el evento más temprano posterior a la fusión de gametos, este evento es fundamental para la activación de los ovocitos; la liberación de  $Ca^{2+}$  es inducido por una enzima denominada *PLCZ* (Kashir *et al.*, 2018), dicha enzima actúa activando como segundo mensajero al inositol trifosfato (IP3) el cual tiene su receptor en el retículo endoplasmático rugoso (RER), al unirse IP3 a su receptor, el RER permite una liberación de oscilaciones de calcio (Berridge, 2009), ejerciendo un papel en la embriogénesis temprana al desencadenar que el ovocito fecundado complete la meiosis y se produzca la activación del cigoto (Saunders *et al.*, 2007). El ARNm de *PLC-Z* es específico de las espermáticas (Ramadan *et al.*, 2012),



estando relacionados los remanentes de *PLCZ* en semen con la cantidad de proteína, ya que se encuentra una relación en la fertilidad del ovocito al contar altas cantidades de proteína o niveles de ARNm (Aghajanpour *et al.*, 2011).

El objetivo fue evaluar la motilidad seminal, cinemática espermática y determinar la expresión del mRNA *PLCZ1* en células espermáticas de sementales criollos y europeos en dos épocas del año (invierno, verano), bajo un sistema de producción con bajos insumos.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades del Bovino Criollo Chihuahuense

En América, los bovinos y distintos animales criollos fueron introducidos por los españoles, siendo *Bos taurus* la primera especie de los bóvidos introducida (McTavish *et al.*, 2013). El ganado bovino llegó al continente americano en 1493 durante el segundo viaje de Cristóbal Colón (De Alba-Martínez, 2011) y fue introducido a México en 1521 por órdenes de Hernán Cortez; para el año 1562, Don Francisco de Ibarra funda el reino de la Nueva Vizcaya, llevando este ganado a esa región que comprende actualmente los estados de Zacatecas, Coahuila, Durango y Chihuahua (Fierro, 1995).

El ganado Criollo Chihuahuense ha habitado ambientes desérticos y semidesérticos propios del Suroeste de Estados Unidos y Norte de México por más de 400 años (Salazar y Cardozo, 1981; De Alba-Martínez, 2011). Actualmente, el ganado Criollo de Chihuahua constituye un recurso genético con características muy importantes de adaptación a ambientes áridos y semiáridos (Anderson *et al.*, 2015). Estas características han sido reportadas por varios autores para razas criollas ubicadas en América (Rouse, 1977; Wilkins, 1984; De Alba-Martínez, 2011). De Alba-Martínez, (2011) indica que el ganado Criollo es reconocido por su resistencia al calor y por su longevidad, esto a pesar de habitar en ambientes con topografía agreste y forraje limitado.

Gracias a la selección natural, el ganado Criollo está ampliamente adaptado a las condiciones climáticas adversas en toda América, lo que le ha dado la capacidad de buscar sustento en grandes superficies, con poco acceso

al agua y diversificar su dieta con el consumo de un amplio número de especies, tanto de pastos como de arbustos y hierbas (Roacho-Estrada *et al.*, 2009; De Alba-Martínez, 2011; Peinetti *et al.*, 2011). Estas son unas de las razones por las que Salazar y Cardozo, (1981) mencionan que el ganado Criollo en Latinoamérica mantiene altos índices reproductivos, longevidad, estabilidad genética y salud, a pesar de los factores adversos del medio ambiente, esta capacidad también es gracias a su talla pequeña.

Ríos-Ramírez, (2019) menciona las siguientes características reproductivas para el ganado criollo de la sierra de Chihuahua: edad al primer parto  $3.5 \pm 0.29$  años, porcentaje de pariciones de  $53.0 \pm 19.8$  %, intervalo entre partos de  $20.2 \pm 0.37$  meses y una edad al destete de  $9.8 \pm 1.17$  meses, destetándose los becerros por sí solos si ningún manejo zootécnico o sanitario. En un hato de Criollo Argentino, con manejo zootécnico y sanitarios adecuados, donde se recabaron datos por 7 años, se reporta una tasa de preñez del 96 %, con un 92.7 % de pariciones y un destete del 90 % (Holgado y Ortega, 2019). Por su parte, en el ganado criollo Romosinuano en Florida, EEUU, se reporta una tasa de pariciones del  $83 \pm 3.4$  %, una tasa de destete del  $81 \pm 3.8$  % y un intervalo entre partos de  $426 \pm 11.46$  d, estas características fueron mantenidas en las cruzas de este ganado con Brahman y Angus, con la excepción del intervalo entre partos, que fue menor ( $374.1 \pm 10.09$  d) en la crusa con Brahman (Riley *et al.*, 2014). Además de sus características reproductivas, el bovino Criollo ha adquirido a través del tiempo, resistencia a enfermedades, rusticidad y adaptabilidad, por lo que constituye un reservorio importante de germoplasma para cruzas potenciales en diferentes ambientes (De Alba, 1981).

El ganado Criollo en pastoreo tiende a ramonear vegetación arbórea y arbustiva, consumir frutos y una diversidad de plantas herbáceas y gramíneas, lo que disminuye el impacto sobre el pastizal, por lo que se le ha llamado “Ganado Ecológico (Fierro y Pamanes, 1998). Recientemente, en un estudio realizado en el desierto de Chihuahua, reportaron el comportamiento de pastoreo de animales Criollo chihuahuense y Angus x Hereford, sobre un potrero compuesto por tres sitios ecológicos: pastizal, arbustivo y herbáceas en campo abierto. Los autores encontraron que de manera general, los Criollo prefirieron con mayor fuerza el sitio de herbáceas en campo abierto y contrario a lo que se esperaba, evitaron el sitio de arbustos, no encontraron diferencia significativa en la preferencia por pastizal entre ambas razas. Interesantemente, la preferencia por el sitio de herbáceas fue afectada por la estación del año, siendo más fuerte la preferencia en la época húmeda, cuando existe un mayor contenido de nutrientes, se infiere que los Criollo pudieron aprovechar este recurso gracias a su tolerancia al calor (Spiegel *et al.*, 2019). Por lo tanto, el ganado Criollo puede mejorar la ganadería en zonas áridas y semiáridas aumentando la producción y favoreciendo la conservación de los ecosistemas.

### **Comportamiento del Criollo en Sistemas Semiáridos**

El mal manejo del ganado en condiciones de pastoreo extensivo ha sido uno de los principales problemas asociados con la degradación de los pastizales, así mismo, la selectividad en el pastoreo y la distribución de los animales sobre el pastizal son dos de los principales aspectos a considerar en el desarrollo de un sistema sostenible (Hormay, 1956). Los animales Criollos sin mucha presión

de selección artificial, mantienen mejores hábitos de pastoreo o ramoneo y ocasionan menores daños al ambiente que los animales de razas europeas como Angus (Peinetti *et al.*, 2011).

En períodos de menor disponibilidad y calidad forrajera los animales de la raza Criollo evidencian patrones de exploración más extensos que la raza Angus, mientras que en períodos de mayor disponibilidad y calidad forrajera no hay diferencias entre razas (Roacho-Estrada, 2008; Peinetti *et al.*, 2011).

En un estudio comparativo entre razas, en el Noroeste de Oregon, el ganado Criollo (Corriente y Longhorn) se alejó  $712 \pm 161$  m en promedio del abrevadero, visitándolo  $0.46$  veces  $d^{-1}$ , mientras que las razas europeas (Angus y Hereford) se alejaron  $493 \pm 124$  m con  $1.02$  visitas  $d^{-1}$  al abrevadero (Sheehy, 2007). Roacho-Estrada, (2008) reporta que en el Rancho Experimental Tesiachic no hubo una diferencia entre razas al alejarse del abrevador, sin embargo, en la Estación Experimental La Jornada se encontró una diferencia ( $P = 0.005$ ) en la distancia alejada del abrevadero para el ganado Criollo  $2.7$  Km  $d^{-1}$  vs ganado Europeo  $2.0$  Km  $d^{-1}$ .

Roacho-Estrada, (2008) reporta que el ganado europeo dedicó más tiempo pastoreando en pastizal mediano abierto con respecto al ganado Criollo ( $10.7$  vs  $9.9$  h  $d^{-1}$ ), ambas razas de ganado mostraron un mayor tiempo de pastoreo durante la época de escases de alimento. Sheehy, (2007) concluye que el ganado español corriente (Corriente y Longhorn) y europeo (Angus y Hereford) tienen diferentes patrones de distribución y selección de hábitat, especialmente cuando la calidad y disponibilidad de forraje es limitada. En ambientes áridos, el ganado europeo tendió a preferir tipos de vegetación con forraje abundante,

buena palatabilidad y calidad nutritiva alta, mientras que el ganado Criollo exhibió interés sobre tipos de vegetación con forrajes fibrosos y de baja calidad nutritiva (Roacho-Estrada, 2008).

Se puede concluir que el ganado Criollo tiene una gran rusticidad ya que esta se compone de un conjunto de características heredables que permite superar las variaciones y adversidades del clima que se presentan, sin disminuir la capacidad reproductiva. La rusticidad se da a través de regulaciones biológicas y de comportamiento (origen y tipo genético) ya que el animal tiene la capacidad de amortiguar el déficit nutricional así como recuperarse lo más rápido posible al mejorar las condiciones en las que se encuentra; adaptarse a las diferencias climáticas teniendo una buena termorregulación; manejarse en la topografía adversa en la que se encuentre y tener la capacidad de recorrer grandes distancias; por último, tener una resistencia a enfermedades infecciosas y parasitarias comunes del lugar donde se encuentren (Villa, 2010). En el desierto de chihuahua en Nuevo Mexico, EEUU, donde las temperaturas superan los 45°C se encontró que la temperatura corporal del ganado europeo (cruza Hereford\*Angus) se elevó por arriba de los 39.5 °C nueve días de 14 días de mediciones, mientras que en el ganado criollo excedió dicha temperatura un solo día, mostrando una mayor capacidad de termorregulación (Nyamuryekung'e *et al.*, 2021).

### **Características Reproductivas del Ganado Criollo Chihuahuense**

El ganado Criollo presenta buenas características reproductivas y una gran longevidad (Duarte, 1997). De Alba-Martínez, (2011) menciona que vacas

criollo lechero en un hato lechero de 33 hembras dejaron 7.2 crías por vaca y diez de estas vacas tuvieron más de 10 partos cada una, además dos de esas vacas dieron lactancias validas hasta el décimo cuarto parto, con estos datos se constata una longevidad de por lo menos 18 años en producción.

En un estudio realizado en Ciudad Juárez, Chihuahua, la mayoría de hembras Criollo Chihuahuense presentaron dos ondas de desarrollo folicular por ciclo, teniendo una buena respuesta ovárica; en relación con razas especializadas, las medidas de cuerpo lúteo y folículos fueron más pequeñas, sin embargo, los niveles hormonales eran los ideales para llevar a cabo la producción de folículos y seguir con la preñez (Quezada-Casasola *et al.*, 2014). En otro estudio en Nayarit, mencionan que utilizar dosis bajas de FSH en hembras criollas es factible para la producción de embriones viables, a diferencia de las razas especializadas en carne y leche que requieren de dosis más altas (Villaseñor González *et al.*, 2017).

Los machos Criollo Chihuahuense presentan buena calidad seminal durante todo el año y buenos niveles de testosterona durante todo el año a diferencia de las razas europeas en las que la calidad seminal y niveles de testosterona disminuyen en la época calurosa (Quezada-Casasola *et al.*, 2016). En un estudio económico para conocer la rentabilidad del ganado Criollo con respecto a razas Europeas en Nuevo Mexico, EUA., utilizaron una relación hembra macho 30:1 a diferencia del ganado europeo que fue de 16:1 (Diaz *et al.*, 2015). Con esos datos se aprecia la gran capacidad reproductiva que tienen los animales Criollo y su excelente libido, sin embargo, los trabajos realizados con machos Criollo, siguen siendo pocos.

## **Análisis Seminal Tradicional y Molecular en Bovinos**

La motilidad masal e individual son de las características más importantes que permiten evaluar la capacidad de desplazamiento de los espermatozoides. Además, su medición es económica, ya que, lo realiza un técnico mediante el uso de un microscopio de luz, sin embargo, este parámetro no asegura el mismo porcentaje de motilidad con cada individuo que lo mida por lo que es muy subjetivo a cada persona (Quintero-Moreno *et al.*, 2017). Se han implementado nuevos métodos para medir la motilidad y cinética espermática con ayuda de computadoras mediante el software CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, por sus siglas en inglés) con los cuales los resultados son más objetivos y utilizados con mayor confiabilidad para el análisis de semen y selección para criopreservación e inseminación artificial (Ormachea *et al.*, 2019).

Tradicionalmente, se han descrito características de un eyaculado como la concentración, motilidad grupal, motilidad progresiva, viabilidad y morfología, pero dichos parámetros no permiten predecir con efectividad la capacidad fecundante del semen (Sharma *et al.*, 2016). Franco *et al.* (2020) inseminaron 658 vacas con semen congelado de ocho toros, a los cuales se les analizó la calidad de semen mediante los métodos tradicionales y se comprobó que todos los toros cumplían con los parámetros de calidad espermática para inseminación artificial, siendo estos parámetros similares entre los diferentes toros. Se realizó el diagnóstico de gestación en 3 ocasiones, a los 24 d, 31 d y 60 d post-inseminación encontrando pérdidas embrionarias diferenciales en cada etapa del diagnóstico, sin involucrar el factor de la hembra, ya que no había una relación entre la edad ni lote de las hembras gestantes con la pérdida embrionaria, pero



si se encontró que la muerte embrionaria era toro-específica, dando como resultado toros con baja mortalidad y otros con una alta mortalidad embrionaria o fetal. Los autores concluyen que es necesario ampliar el análisis y selección seminal a características químicas y moleculares del semen para tener un mayor porcentaje de preñez o un menor porcentaje de pérdida embrionaria y fetal.

Se ha reportado que las diferencias en el perfil de ARNm en el semen tienen relación con la calidad seminal y porcentaje de concepción (Avendaño *et al.*, 2009), por lo que conocer estos datos es de gran utilidad para la selección de sementales y utilización de semen criopreservado para la reproducción aplicada (Franco *et al.*, 2020).

### **El ARN en el Espermatozoide**

El espermatozoide es el resultado de la espermatogénesis, es un proceso de diferenciación celular en el que una célula normal diploide se convierte en una célula haploide, adquiriendo características morfológicas (Figura 1a) específicas que le permiten alcanzar y fertilizar el ovocito (Paronetto y Sette, 2010). Dentro de la diferenciación celular de espermátida a espermatozoide se lleva a cabo un cambio en la estructura de la cromatina, remplazando a la mayoría de histonas por protaminas, lo cual compacta más el ADN, lo que posteriormente hace incapaz al espermatozoide de estar transcripcionalmente activo (Dadoune *et al.*, 2004). Para compensar esta falta de síntesis de ARNm en las fases de espermatogénesis, los espermatocitos paquíteno y espermátida redonda almacenan ARNm en partículas de ribonucleoproteína para proteger a estos ARNm (Kleene, 2001), manteniéndolos estables hasta el comienzo de la

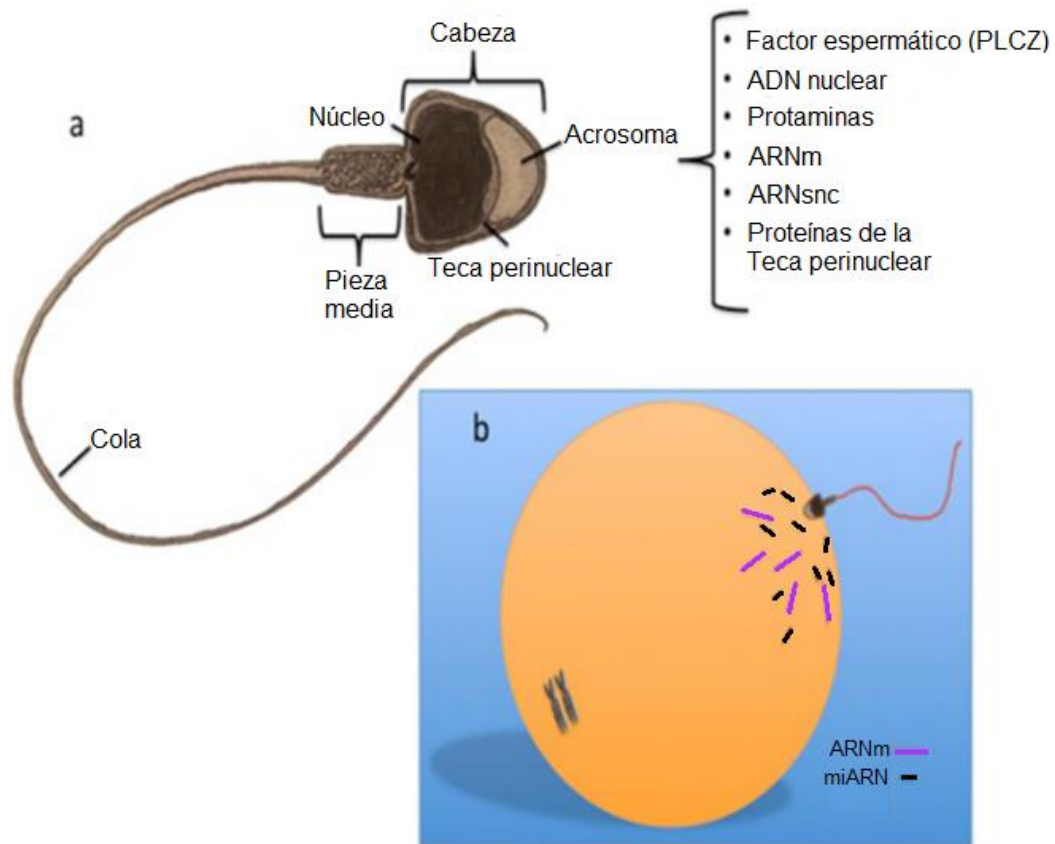


Figura 1. Estructura espermática y contenido transferido al ovocito en la fertilización, modificado de (Al-Gazi y Carroll, 2016). a) El espermatozoide fertilizante introduce además del genoma paterno, también, el factor de activación de ovocitos (PLCZ), proteínas tcales, postacrosomales y perinucleares y centriolos; b) Los espermatozoides contienen una población compleja de ARN, que incluye transcritos de ARN mensajero (ARNm), ARNs pequeños no codificantes (ARNsnc) y microARN (miARN) que también se introducen al ovocito tras la fertilización.

expresión del genoma embrionario (Boerke *et al.*, 2007). Existen estudios recientes que sugieren que los ARN codificantes y no codificante no son sólo un remanente resultado de la espermatogénesis, sino una cuidadosa selección de ARN que tiene como propósito traducirse en una proteína después de la fertilización del ovocito, por lo que existe una relación entre los perfiles de expresión con la baja o alta fertilidad en bovinos (Fair y Lonergan, 2018). Con esto, podemos decir que el espermatozoide aporta más, que solo el genoma paterno al ovocito (Figura 1b).

### **El Papel del ARN Espermático**

El papel del espermatozoide no se reduce solamente a llevar y transmitir el genoma paterno, si no suministrar también ARNs que tienen una función específica en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Valcarce *et al.*, 2018). Según Boerke *et al.* (2007), los ARNs del esperma se dividen en tres grupos: a) ARNs sin función, como protamina-2 y otros ARN que son degradados rápidamente y no tienen ninguna utilización dentro del ovocito; b) ARN con una función potencial, como el ARNm *PLCZ* que codifica para una enzima con un papel fundamental en la activación del embrión mediante la liberación de oscilaciones de calcio; y c) ARNs extraños, los cuales son ARNs que no se encuentran en las células de los testículos pero que migran del epidídimo o próstata hacia el espermatozoide y pueden ser de importancia para el desarrollo embrionario. Se presume, que la fertilidad del toro se asocia a diferencias en los patrones de metilación del ADN en los espermatozoides y que los perfiles

transcriptómicos embrionarios están influenciados por el estado de fertilidad del toro (Kropp *et al.*, 2017).

Kropp *et al.* (2017) mencionan que a pesar de una morfología y desarrollo similar entre etapas de blastocistos derivados de toros de alta y baja fertilidad, los embriones no presentan una diferencia significativa en la fertilización *in vitro*; sin embargo, muestran diferencias transcriptómicas significativas. Por esas razones, la combinación del método tradicional de evaluación seminal con la identificación de marcadores moleculares en eyaculados de semen que permitan una mejor selección, sería un gran complemento para mejorar el porcentaje de preñez en los bovinos (Franco *et al.*, 2020).

### **PLCZ**

Según la base de datos del NCBI el gen de *PLCZ1* se encuentra en el cromosoma 5 del bovino, su ARN mensajero cuenta con un total de 2250 pb, dicho mensaje codifica para una proteína de 634 aa.

En la fertilización de mamíferos, el espermatozoide que fertiliza es quien estimula la activación del cigoto, siendo un evento fundamental que inicia el desarrollo embrionario (Nomikos *et al.*, 2017). Esta activación se lleva a cabo por el inicio de una liberación de oscilaciones de calcio<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>). Dicha liberación de oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> es inducida por una enzima específica del espermatozoide denominada fosfolipasa C zeta (PLCZ) (Kashir *et al.*, 2018). Hachem *et al.* (2017) mencionan que en ratones transgénicos con nula expresión de *PLCZ1*, se manifestó mayor porcentaje de polispermia, sin desencadenamiento de oscilaciones de calcio, y en la cruce de animales con expresión normal con

transgénicos se encontró un bajo porcentaje de concepción. Los espermatozoides de epidídimo de ratones transgénicos con nula expresión de *PLCZ1* conseguían cumplir con los parámetros de calidad seminal para lograr la fecundación y desarrollo del embrión, sin embargo, no se logró la fertilización exitosa (Hachem *et al.*, 2017). Todo esto, indica la gran importancia de *PLCZ1* en la concepción, ya que, aun encontrando buenas características seminales se logran absorciones o muertes embrionarias tempranas por la presencia o ausencia de moléculas como ARNm y/o proteínas en los espermatozoides (Franco *et al.*, 2020).

La enzima *PLCZ* cumple con los criterios de factor de espermatozoide soluble responsable de la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la fertilización (Saleh *et al.*, 2020). Dicha enzima *PLCZ* se encuentra localizada en el espermatozoide a nivel de la teca perinuclear, junto al acrosoma (Kashir *et al.*, 2018), de aquí es administrada por el espermatozoide al ovocito, dicha enzima induce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la vía de señalización del 1,4,5-trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ). Al entrar *PLCZ* al ovocito se une a vesículas con moléculas de 4,5 difosfato de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ), donde, comienza a hidrolizar los  $\text{PIP}_2$  en  $\text{IP}_3$ , funcionando éste como segundo mensajero, el cual tiene su receptor en la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER), al unirse  $\text{IP}_3$  a su receptor en el RER comienza la liberación de iones calcio que dan inicio a la activación del cigoto (Figura 2) (Berridge, 2009; Nomikos *et al.*, 2017; Kashir *et al.*, 2018; Saleh *et al.*, 2020).

Desde el descubrimiento de *PLCZ* en 2002 en el que se demostró la capacidad para generar oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , microinyectando ARN

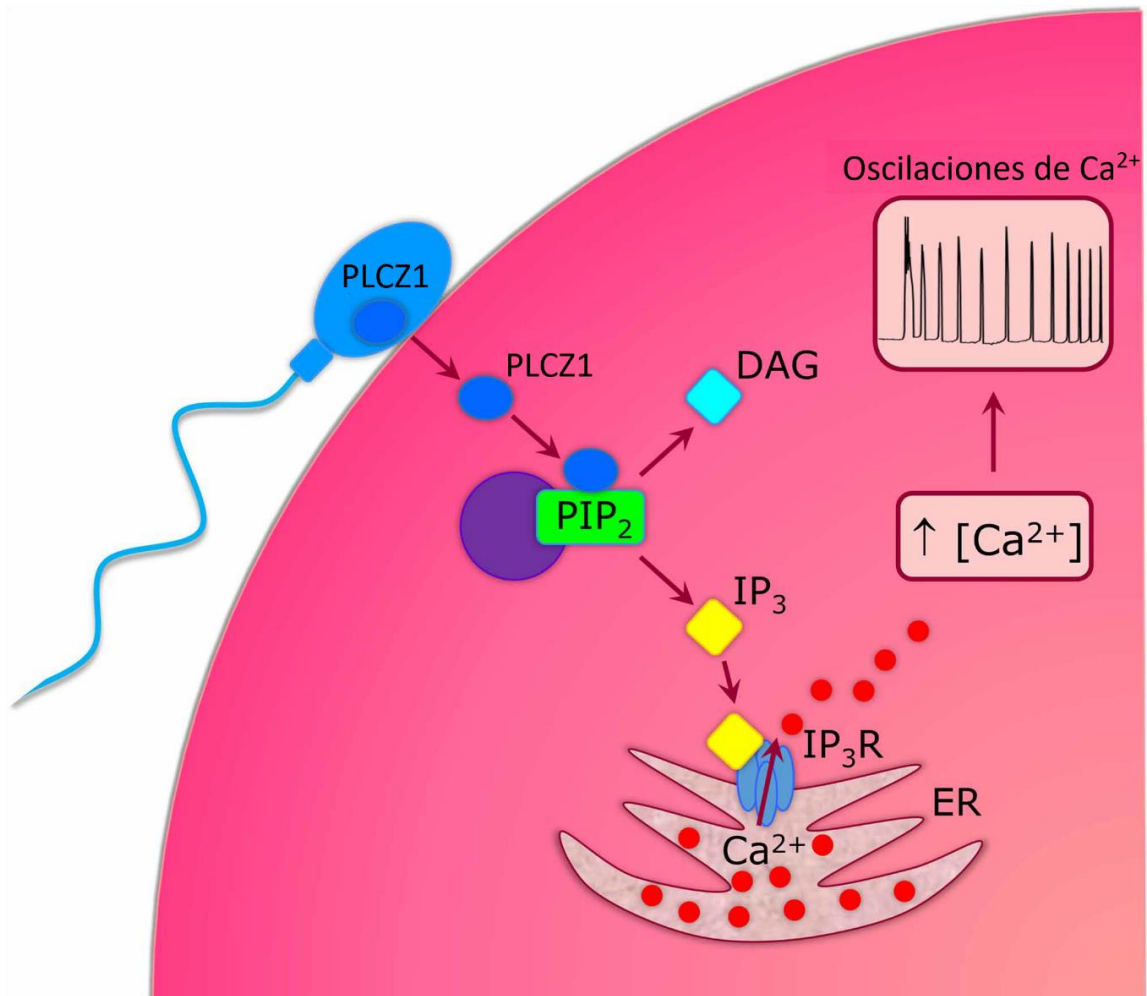


Figura 2. Representación esquemática de la activación del óvulo desencadenada por *PLCZ1* específica de espermatozoide. Modificado de Nomikos *et al.* (2017).

complementario de *PLCZ* en ovocitos de ratón, en los cuales hubo una liberación de oscilaciones de  $Ca^{2+}$  idénticos a los que induce el espermatozoide en la fertilización en mamíferos (Saunders *et al.*, 2002; Bedford-Guaus *et al.*, 2008), hasta ahora, se ha ganado una amplia aceptación como el “factor espermático” fisiológico que juega un papel importante en la fertilización de mamíferos (Kashir *et al.*, 2018). Varios estudios (Bedford-Guaus *et al.*, 2008; Hachem *et al.*, 2017; Atabay *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020) concuerdan en que existe una gran relación en la fertilización de los ovocitos con la expresión del ARNm *PLCZ1*, ya que a menor expresión existe una menor fertilización y a mayor expresión una mayor fertilización de ovocitos. Aghajpour *et al.* (2011) midieron la expresión de ARNm de *PLCZ* en eyaculados de hombres y los dividieron en dos grupos de expresión, con expresión baja y alta. Con estos grupos de eyaculados hicieron fertilizaciones con dos métodos: inyección espermática intracitoplasmática (ICSI, por sus siglas en inglés) e *in vitro* (FIV). Con los eyaculados de baja expresión ( $41.7 \pm 7.7$ ) obtuvieron un porcentaje bajo de fertilización ( $20.3 \pm 2.9$  %) y los de alta expresión (ICSI  $119.1 \pm 22.8$ , FIV  $102.6 \pm 2.1$ ) tuvieron altos niveles de fertilización (ICSI  $83.2 \pm 4.5$  %, FIV  $73.6 \pm 6.9$  %). Atabay *et al.*, (2019) midieron la expresión de ARNm de *PLCZ1* en espermatozoides de búfalos de agua, encontrando diferencias de su expresión entre individuos. Al realizar FIV con los eyaculados de los búfalos encontraron que los animales que tenían poca expresión no fertilizaron o hubo poca fertilización de los ovocitos y conforme tenían una mayor expresión también aumentaban los porcentajes de FIV.

## Efecto de la Nutrigenómica en los Espermatozoides

La nutrigenómica es la ciencia que estudia los efectos de la nutrición sobre la expresión génica (Müller y Kersten, 2003). Al utilizar una dieta distinta o suplementación con distintos componentes como aceites, minerales, vitaminas, ácidos grasos y demás productos alimenticios, cambian los perfiles de expresión de ciertos genes de interés entre una dieta control y otra con algún tipo de suplemento (Vargas Hernández, 2016). El tipo de dieta que consumen los animales tiene como consecuencia una modificación en la expresión génica en diferentes tejidos y células, incluidos los espermatozoides (Fullston *et al.*, 2016; Venkata Krishnaiah *et al.*, 2019). En un estudio realizado con ratones de laboratorio, en el cual se les proporcionó una dieta alta en grasas (DAG) por 10 semanas, comparándolo con el grupo de la dieta control (DC), se observó que la concentración del eyaculado fue similar (DAG,  $8.71 \pm 1.01 \times 10^6$  / mL, y DC,  $8.41 \pm 0.44 \times 10^6$  / mL) con una diferencia significativa ( $p = 0.0023$ ) en la motilidad DC  $83.1 \pm 2.6$  % contra DAG  $65.1 \pm 4.4$  % y en la expresión de 13 microARN ( $p < 0.05$ ) en el eyaculado, siendo mayor la expresión de estos microARN en los ratones con la DAG (Fullston *et al.*, 2016). En otro estudio con machos cabríos a los cuales se les suplementó con Zn y Cu se midió la expresión de dos ARNm *ODF2* y *ZCCHC6* relacionados con la producción de testosterona y el número de espermatozoides por eyaculado. La expresión del gen *ODF2* fue mayor ( $P < 0.05$ ) en la suplementación de 40 mg de Zn ( $3.8 \pm 0.05$ ) y 25 mg de Cu ( $2.4 \pm 0.04$ ), que en la suplementación de 37.5 mg Cu ( $0.2 \pm 0.1$ ) y con respecto al control ( $1 \pm 0.4$ ). La expresión del gen *ZCCHC6* fue significativamente mayor con la suplementación de 40 mg de Zn ( $4.7 \pm 2.0$ ), 12.5 mg de Cu ( $9.9 \pm 4.0$ ), 25 mg Cu



( $3.6 \pm 0.04$ ), así como también, los machos suplementados con combinación de Zn y Cu: 20 mg de Zn + 12.5 mg de Cu ( $4.1 \pm 1.2$ ), 40 mg de Zn + 25 mg de Cu ( $3.0 \pm 1.0$ ) y 60 mg de Zn + 37.5 mg de Cu ( $14.1 \pm 5.0$ ) en comparación con el control ( $1 \pm 0.05$ ) (Venkata Krishnaiah *et al.*, 2019).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de Estudio**

Los toros se encontraban en el Rancho Experimental Teseachi, propiedad de la Universidad Autónoma de Chihuahua, localizado al Este de la Sierra Madre Occidental (28° 48' N; 107° 25' E), a 15 km de la Colonia Oscar Soto Máñez, municipio de Namiquipa, Chihuahua, México. El clima en el Rancho Experimental Teseachi es característico de las regiones montañosas con inviernos fríos y veranos calurosos. Las elevaciones varían entre los 1,900 y 2,800 msnm, con topografía caracterizada por laderas suaves y quebradas. Los toros permanecieron en un potrero común con una extensión de 80 ha.

La colecta de semen y el análisis al microscopio, se realizó en los corrales de manejo del rancho. El análisis de calidad seminal por software CASA se realizó en las instalaciones del Centro de Biotecnología y Reproducción de la Unión Ganadera Regional de Chihuahua ubicado en el kilómetro 35 de la carretera Chihuahua-Cuauhtémoc, municipio de Santa Isabel. El congelamiento de semen y los ensayos de análisis de expresión se llevaron a cabo en el Laboratorio de Procesamiento de Semen e Inseminación Artificial y el Laboratorio de Biología Molecular, respectivamente, en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua. El estudio se realizó en dos etapas experimentales independientes.

## **Etapa 1**

**Descripción de los animales.** Para el análisis de calidad seminal con el sistema CASA se evaluó el eyaculado de 8 toros (4 Criollos y 4 Angus), con una edad de 2 años. Estos toros se encontraban pastoreando en el mismo potrero y con restricción de suplementos (sólo sales minerales). Al inicio del estudio los toretes se examinaron para garantizar un buen estado de salud general.

**Recolección y evaluación seminal.** El semen se colectó por duplicado de cada animal, con un intervalo de cinco días, utilizando electroestimulación, con un dispositivo de electrodos bipolar con diámetro de 60 mm y un mango colector conectado mediante un cono de plástico a un tubo cónico graduado, estéril, con capacidad de 15 mL y se procedió a su evaluación.

**Análisis macroscópico y microscópico.** Las características macroscópicas en el eyaculado fueron evaluadas mediante lo descrito por Zemjanis (1987), las cuales incluyen volumen, color, olor y densidad del semen. El volumen se evaluó dentro del tubo cónico de 15 mL en el que se recolectaron las muestras, el color fue evaluado a simple vista, el olor se evaluó para descartar eyaculados con olor pútrido, ya que puede ser indicador de infección o patologías a lo largo del tracto reproductivo. Después de confirmar la calidad seminal se procedió a realizar una dilución usando el diluyente comercial OptidyI™ de la marca CRYO-VET. Antes de la obtención de la muestra, el diluyente se preparó con agua inyectable a una proporción de 3:2. Posteriormente, el diluyente se estabilizó a 37 °C, se colocaron 10 mL de diluyente preparado en tubos de 50 mL

y se colocaron dentro de un baño María con la mitad de agua, a 37 °C y colocado dentro de una hielera.

Al obtener la muestra de semen, se colocó dentro de cada tubo previamente rotulado con la información del toro y al tener todas las muestras recolectadas se adicionó hielo entre el espacio de la hielera y el baño María para que la temperatura disminuyera lentamente hasta llegar a 5 °C, las muestras fueron transportadas durante tres horas para realizar el análisis por computadora.

**Análisis de calidad seminal con software CASA.** La motilidad, parámetros de concentración y cinemática espermática se determinaron mediante el sistema computarizado de análisis de semen (CASA; IVOS Versión 12, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA). Posterior al análisis se llevó a cabo la congelación en nitrógeno líquido y posteriormente se volvieron a analizar las muestras al descongelar las pajillas.

Para el análisis en el sistema CASA se realizó una dilución aproximada de 1:20 (dependiendo de la concentración de cada eyaculado) de la muestra con el diluyente comercial Optidyl<sup>MT</sup>, hasta poder ser contabilizado. Al tener la muestra diluida se tomó una alícuota de 10 µL y por capilaridad se llenó una cámara de análisis de motilidad (20 mm, Leja 4, Leja Products Luzernestraat B. V., Holanda) precalentada a 37 °C. La lectura se determinó mediante el programa SpermVision<sup>TM</sup> (MiniTube, versión 3.0, EE.UU.) conectado a un microscopio Olympus CX 41 (Olympus, Japón), contabilizando un total de 500 células espermáticas por muestra.

Posterior al proceso de descongelación, la muestra por pajilla se diluyó (50 µL de muestra + 100 µL del mismo diluyente Optidyl<sup>MT</sup> utilizado para la

criopreservación) y fue evaluada inmediatamente, de la misma forma que se analizó el semen refrigerado.

Los parámetros de movimiento de espermatozoides registrados fueron: motilidad total (%; MT), motilidad progresiva (%; MP), distancia en el camino promedio ( $\mu\text{m}$ ; DAP), distancia en línea recta ( $\mu\text{m}$ ; DSL), distancia en línea curva ( $\mu\text{m}$ ; DCL), velocidad media ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ; VAP), índice de rectitud (%; STR), índice de linealidad (%; LIN), amplitud media de desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ ; ALH), frecuencia de batido de cola (Hz; BCF); e índice de oscilación (%; WOB).

## **Etapa 2**

**Descripción de los animales.** Para la extracción de ARN de células espermáticas y medición de la expresión, se utilizaron tres toros Criollos y tres toros europeos (2 Hereford y 1 Angus), de entre 3 y 4 años de edad. Éstos toros se encontraban pastoreando en el mismo potrero, suplementados únicamente con sales minerales y bloques proteicos en el agostadero. La colección de semen se realizó en dos épocas del año (invierno y verano), colectando muestras por triplicado de cada toro en cada una de las épocas, con intervalo de cinco días. Al inicio del estudio, los toros se examinaron para garantizar un buen estado de salud general.

**Recolección y evaluación seminal.** El semen se obtuvo como se describe en la Etapa 1. Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas del semen. Al confirmar buena calidad, se tomaron 2 mL de semen, los cuales fueron centrifugados en una centrifuga (Prism mini) a 4,000 rpm para eliminar el líquido seminal y obtener el pellet celular que posteriormente

fue almacenado directamente en nitrógeno líquido para su transporte. Después se almacenó a -80 °C hasta su utilización en pasos subsiguientes.

**Análisis macroscópico y microscópico.** Las características macroscópicas en el eyaculado fueron evaluadas como se describe en la Etapa 1. La motilidad grupal e individual se determinaron de manera subjetiva con un microscopio (Velab™) a 10 X y 40 X, respectivamente. La concentración se midió al descongelar y purificar el pellet celular almacenado, con la intención de utilizar el mismo número de células para la extracción de ARN total, utilizando la cámara de Neubauer con el mismo microscopio a 40 X.

**Purificación de células espermáticas.** Con el fin de eliminar impurezas y otro tipo de células ajenas a espermatozoides que estuvieran presentes en la muestra y garantizar la extracción de ARN únicamente de espermatozoides, se purificó el semen con el sistema comercial BoviPure™ System (Nidacon).

El paquete celular se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se colocaron 4 mL de BoviPure al 50%, diluido con BoviDilute™ (Nidacon) en un tubo de 15 mL, y sobre éste se colocó el mililitro de espermatozoides en PBS, en capas, sin mezclar la muestra con el BoviPure al 50 %. Utilizando una centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5810R) se centrifugó a 1,280 rpm durante 20 min, se retiró el sobrenadante cuidadosamente sin molestar el pellet celular. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS cada uno y centrifugando a 2,390 rpm durante 5 min cada vez, a una temperatura de 4 °C. Al finalizar, el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS, después se realizó un conteo en la cámara de Neubauer para hacer alícuotas de 60 millones de células y realizar la extracción de ARN (Parthipan *et al.*, 2015).

**Extracción de ARN y síntesis de ADNc.** Se extrajo ARN total a partir de 60 millones de células espermáticas utilizando el Kit Direct-Zol™ RNA MiniPrep (ZYMO). Se peletizaron las alícuotas a 4,000 rpm. Al obtener el pellet celular, se resuspendió en 1 mL de Trizol y se incubó a una temperatura de 65 °C por 30 min. Posteriormente, se siguieron las indicaciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se almacenó a -80 °C hasta su utilización en la síntesis de ADNc.

Se sintetizó ADNc a partir de las extracciones de ARN utilizando el kit PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time (Takara), a partir de 250 ng de ARN total siguiendo las indicaciones del fabricante. Antes de la síntesis se mezclaron las tres muestras de cada toro en cada época del año.

**Control de calidad del ARN espermático.** Para verificar que las muestras de ARN no estuvieran contaminadas con ARN de otro tipo de células que no fueran espermáticas, se realizaron diversas PCR en tiempo real para tres genes específicos de: células somáticas, células germinales y leucocitos con las que se pudiera haber contaminado la muestra. Además, se realizó una PCR para el gen de protaminas que amplifica ADN genómico (ADNg) y ADNc de manera diferencial, para descartar la presencia de ADNg en el ARN obtenido.

Para la amplificación del gen *CDH1* (células somáticas) se utilizaron los oligonucleótidos CDH1-F (5´ CTGCATTCCTGGCTTTGGTG 3´) y CDH1-R (5´ GTAAGCACGCCATCTGTGTG 3´) que flanquean un fragmento de 171 pares de bases (pb); para amplificar el gen *KIT* (células germinales) se utilizaron los

oligonucleótidos KIT-F (5' GAATAGCTGGCATCAGGGTG 3') y KIT-R (5' CCAGATCCACATTCTCTCCATC 3') que flanquean un fragmento de 224 pb; para amplificar el gen *PTPRC* (leucocitos) se utilizaron los oligonucleótidos PTPRC-F (5' ACCCAACCTTCTACTCAAGATG 3') y *PTPRC-R* (5' CGTATTTGTTCTCACATGGTGG 3') que flanquean un fragmento de 124 pb y para amplificar el gen PRM1 (protamina ARN y ADNg) se utilizaron los oligonucleótidos PRM1-F (5' AAGATGTCTGCAGACGAAGGAG 3') y PRM1-R (5' GTGGCATTGTTCGTTAGCAGG 3') que flanquean un fragmento de 222 pb si está limpio de ADNg, y de 322 pb para ADNg. Todos estos oligonucleótidos fueron previamente reportados por Selvaraju *et al.* (2017).

**Diseño de oligonucleótidos para qPCR.** Los oligonucleótidos para el gen *PLCZ1* de bovino y para el gen  $\beta$ -actina ( *$\beta$ -Act*) fueron diseñados utilizando el programa primer-BLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), con base en las secuencias de referencia del banco de genes NM\_001011680.3 y AY141970.1 para *PLCZ1* y  *$\beta$ -Act*, respectivamente.

Para la amplificación de *PLCZ1* se realizó una PCR en tiempo real con los oligonucleótidos PLCZ1-F (5' AACTTAGCCTCCAGAACAGCC 3') y PLCZ1-R (5' CGCTTGGCAAGAAAGGGATTC 3') que flanquean un fragmento de 91 pb. Para la amplificación de  *$\beta$ -Act* se utilizaron los oligonucleótidos BBactin-F (5' CGGGACCTGACGGACTACCT 3') y BBactin-R (5' TGTCACGGACGATTTCCGCTC 3') que flanquean un fragmento de 88 pb.



**Cuantificación de transcritos del gen *PLCZ1*.** La reacción de qPCR fue realizada en un termociclador (AB Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System) en un volumen final de 10  $\mu$ L conteniendo 5  $\mu$ L de 2X powerUp™ SYBER™ Green Master Mix, 900 nM de oligonucleótidos *PLCZ1* o 500 nM de oligonucleótidos  $\beta$ -*Act* y agua libre de nucleasas más 1  $\mu$ L de ADNc proveniente de 50 ng/ $\mu$ L de ARN total, para el caso de tejido testicular y 12.5 ng/ $\mu$ L para células espermáticas.

Cada corrida de qPCR se acompañó de una curva estándar compuesta de 6 puntos, con un rango dinámico de 12.5 a  $5.14 \times 10^{-2}$  correspondiente al ARN total y generada en diluciones seriadas 1:3 del punto más concentrado.

Las condiciones de la PCR para *PLCZ1* fueron las siguientes: 50 °C por 2 min para la activación de la enzima y 95 °C por 2 min para la desnaturalización, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 53 °C, y 40 s a 72 °C. Para  $\beta$ -*Act* fueron las siguientes: 50 °C por 2 min para la activación de la enzima y 95 °C por 2 min para la desnaturalización, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 58 °C, y 40 s a 72 °C. Ambas PCR se corrieron con una única medición de la señal de fluorescencia en la etapa de extensión, y una curva de disociación final que aumenta 0.3 °C en cada ciclo de 5 s desde 60 °C hasta 95 °C.

La expresión de *PLCZ1* se reporta en relación a la expresión de  $\beta$ -*Act* con el método de  $2^{-\Delta CT}$  (Schmittgen y Livak, 2008).

### **Análisis Estadístico**

En la Etapa 1, para el análisis de la motilidad total y progresiva, junto a la cinemática espermática, se ajustó un modelo con los efectos fijos de raza, estado

del semen (refrigerado y descongelado) y su interacción y cómo efecto aleatorio al toro, utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999).

En la Etapa 2, para el análisis estadístico de las variables de motilidad individual, motilidad grupal y la expresión de PLCZ1, se ajustó un modelo que incluyó los efectos fijos de época, raza y su interacción, con el procedimiento PROC GLM de SAS (versión 9.2; SAS Institute, Inc., 1999).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etapa 1

**Motilidad total y progresiva.** Las medias  $\pm$  E.E. para los porcentajes de motilidad total (MT) y progresiva (MP) en semen refrigerado y posdescongelado de bovinos Criollo Chihuahuense y Angus se presentan en el Cuadro 1. Para la MT se encontró un efecto por el estado de conservación del semen, siendo este mayor ( $P < 0.05$ ) en el semen refrigerado ( $54.43 \pm 5.86$  %) que en el semen posdescongelado ( $32.28 \pm 5.86$  %), sin embargo, no se encontró una diferencia por efecto de raza. En los porcentajes de MP no se encontró ninguna diferencia ( $P < 0.05$ ) por el estado del semen ni por grupo racial; sin embargo, se logra ver una tendencia a un mejor porcentaje de MP ( $P = 0.36$ ) en el semen de ganado Criollo ( $14.76 \pm 4.99$ ) con respecto al Angus ( $7.53 \pm 4.99$ ).

La motilidad es uno de los parámetros más utilizados para la evaluación de calidad espermática, ya que, es representativa del estado energético de los espermatozoides, siendo éste un aspecto importante para llevar a cabo la fecundación (Carvajal-Serna *et al.*, 2017).

Los datos obtenidos en este estudio difieren de los obtenidos por otros autores, ya que, ellos encuentran mayores porcentajes de MT y MP. Valdez-Torres (2018) encontró que la motilidad total al posdescongelamiento fue de  $56.78 \pm 3.89$  %, siendo mayor al obtenido en este estudio, y semejante a los datos obtenidos del semen refrigerado. En un estudio en el que comparan semen fresco, refrigerado y posdescongelado, obtuvieron valores para MT de 94.3, 89.4 y 63.0 %, respectivamente. Para MP obtuvieron 65.9, 58.2 y 30.8 %

Cuadro 1. Medias  $\pm$  error estándar para el porcentaje de motilidad total y progresiva en semen bovino refrigerado y semen posdescongelado

Estado	Móvil	Progresivo
Refrigerado	54.43 $\pm$ 5.86 <sup>a</sup>	11.35 $\pm$ 4.27
Posdescongelado	32.28 $\pm$ 5.86 <sup>b</sup>	10.95 $\pm$ 4.27

<sup>a, b</sup> Literales distintas significan diferencia estadística entre filas (P<0.05)

respectivamente (Sundararaman *et al.*, 2012). En otro estudio en el que se midió la MP utilizando distintos antioxidantes (Cisteína, Cafeína, Ácido Ascórbico y *Rhus trilobata*) reportan los siguientes resultados al descongelado  $17.58 \pm 3.31$ ,  $13.59 \pm 3.31$ ,  $18.10 \pm 3.31$  y  $23.07 \pm 3.31$  %, respectivamente (Valdez-Torres, 2018). En este caso se puede observar que la MP en semen descongelado puede tener un amplio rango de variación y los resultados en este estudio coinciden con los obtenidos en el presente estudio al utilizar cafeína. Los porcentajes de motilidad obtenidos en este trabajo están por debajo de los obtenidos en otros trabajos. Sin embargo, se puede observar una relación en la disminución de la motilidad de 20 puntos porcentuales entre el semen refrigerado y descongelado, similar a lo obtenido en este estudio para los distintos estados del semen.

Es importante mencionar que los bajos porcentajes de MT y MP se encontraron en ambos grupos raciales y pueden ser atribuidos a dos razones: la primera, al traslado, ya que el camino era muy áspero y el vehículo tenía mucho movimiento, con el cual se pudieron afectar varias células espermáticas; y la segunda, a la condición corporal en la que se encontraban los toros, ya que, éstos se encontraban en agostadero sin la suplementación que normalmente se les da a los toros en desarrollo. (Singh *et al.*, 2019).

**Cinemática espermática.** Las medias  $\pm$  E.E para las variables de cinemática espermática se presentan en el Cuadro 2. Se puede observar que para las características de DAP, DSL, VSL y BCF no se observó efecto ( $P > 0.05$ ) de estado de semen ni de grupo racial. Sin embargo, en las características de velocidad (VAP y VCL), DCL, STR, LIN, ALH y WOB se encontró una diferencia

Cuadro 2. Medias  $\pm$  error estándar de características cinemáticas en semen de toros Criollo Chihuahuense y Angus, refrigerado y posdescongelado obtenidos mediante el análisis espermático asistido por computadora (CASA).

Características cinemáticas <sup>1</sup>	Refrigerado		Descongelado	
	A	C	A	C
DAP	26.14 $\pm$ 2.21	23.37 $\pm$ 2.21	20.17 $\pm$ 2.21	21.94 $\pm$ 2.21
DSL	17.59 $\pm$ 1.81	18.18 $\pm$ 1.81	15.05 $\pm$ 1.81	17.51 $\pm$ 1.81
DCL	50.54 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>	50.73 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>	34.43 $\pm$ 4.95 <sup>b</sup>	37.27 $\pm$ 4.95 <sup>b</sup>
VAP	65.53 $\pm$ 4.63 <sup>a</sup>	70.78 $\pm$ 4.63 <sup>a</sup>	48.26 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>	51.07 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>
VSL	43.81 $\pm$ 4.11	48.87 $\pm$ 4.11	35.65 $\pm$ 4.11	40.53 $\pm$ 4.11
VCL	122.94 $\pm$ 10.39 <sup>a</sup>	131.03 $\pm$ 10.39 <sup>a</sup>	80.92 $\pm$ 10.39 <sup>b</sup>	85.74 $\pm$ 10.39 <sup>b</sup>
STR	67.07 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>	68.83 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>	75.15 $\pm$ 2.33 <sup>b</sup>	79.69 $\pm$ 2.33 <sup>b</sup>
LIN	36.23 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	37.83 $\pm$ 1.61 <sup>a</sup>	45.99 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>	49.43 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>
ALH	8.36 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	8.38 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	5.75 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	5.33 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>
BCF	15.85 $\pm$ 1.08	16.38 $\pm$ 1.08	15.76 $\pm$ 1.08	19.14 $\pm$ 1.08
WOB	54.04 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	54.78 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	60.93 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>	61.38 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>, <sup>b</sup> Literales distintas significan diferencia estadística entre medias estado de semen ( $P < 0.05$ ) a través de columnas.

<sup>1</sup> DAP, Distancia en el Camino Promedio; DSL, Distancia en Line Recta; DCL, Distancia en Línea Curva; VAP, Velocidad Media; VSL, Velocidad Rectilínea; VCL, Velocidad Curvilínea; STR, Índice de Rectitud; LIN, Índice de Linealidad; ALH, Amplitud Media de Desplazamiento Lateral de la Cabeza; BCF, Frecuencia de Batido de Cola; WOB, Índice de Oscilación.

( $P < 0.05$ ) por estado del semen. Las características cinemáticas están muy relacionadas con la fertilidad, ya que facilitan el avance de las células espermáticas a través del tracto reproductor de la hembra (Sariözkan *et al.*, 2015). Kathiravan *et al.* (2011) mencionan que de las diferentes características de movimiento de los espermatozoides evaluadas por el sistema CASA, los parámetros VAP, VCL y VSL son los que mejor predicen la fertilidad del semen en toros.

Los datos obtenidos del semen al descongelarlo en el presente estudio coinciden con los obtenidos por Valdez-Torres (2018), a excepción de las características de velocidad (VAP, VSL y VCL), ya que éstas presentan valores de entre 20 y 35 puntos más altos que los obtenidos en el presente estudio. Sundararaman *et al.* (2012) también reportan resultados similares al descongelamiento en los parámetros de ALH, BCF y STR; sin embargo, los resultados en las características de velocidad (VAP, VSL y VCL) son similares a los que obtuvo Valdez-Torres (2018). Los bajos valores en las características de velocidad obtenidos en el presente estudio se atribuyen a los bajos porcentajes de MT y MP obtenidos antes y después de la criopreservación, ya que al ser parámetros de velocidad están relacionados con los porcentajes de motilidad. Como se mencionó anteriormente, la calidad del semen pudo haberse afectado por el traslado del rancho al sitio de evaluación con el sistema CASA, siendo el efecto en ambos grupos raciales, ya que no se encontraron diferencias estadísticas debido al factor raza. Sin embargo, el planteamiento del trabajo radica en que toros con similares características seminales pueden estar relacionados con diferentes porcentajes de preñez exitosa por la presencia o

ausencia de moléculas como ARNm y/o proteínas en los espermatozoides (Franco *et al.*, 2020).

## **Etapas 2**

**Motilidad individual y grupal.** Las medias  $\pm$  E.E para Motilidad Individual (MI) y Motilidad Grupal (MG) de semen fresco en las dos épocas del año (invierno y verano) de bovinos Criollo Chihuahuense y Europeo se presentan en el Cuadro 3. Se puede observar que no hubo una diferencia ( $P > 0.05$ ) en el porcentaje de motilidad individual; sin embargo, en la motilidad grupal si se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la interacción de raza por época. La diferencia en MG entre los toros Criollos y Europeos ( $58.88 \pm 2.8$  vs  $77.7 \pm 2.8$  %, respectivamente) fue más pronunciada ( $P < 0.05$ ) en el verano comparada con la del invierno ( $76.6 \pm 2.8$  vs  $71.1 \pm 2.8$  %; Gráfica 1).

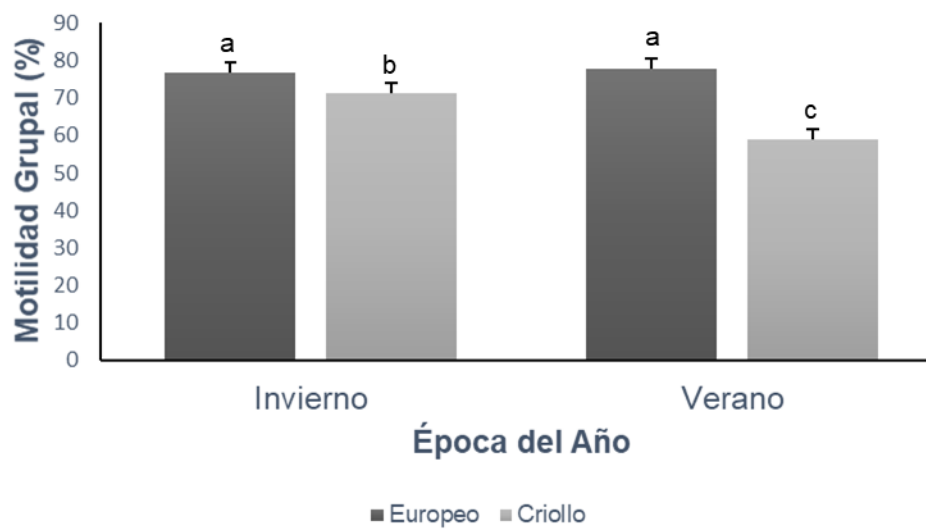
Los datos obtenidos de Motilidad Individual del Criollo en invierno ( $72.2 \pm 4.3$  %) y verano ( $64.4 \pm 4.3$  %) son semejantes a los obtenidos por Villatoro-Salinas *et al.* (2016) en sementales Criollo Lechero de Veracruz, época fresca ( $68.3 \pm 5.4$  %) y época calurosa ( $75.7 \pm 5.4$  %). Quezada-Casasola *et al.* (2016) reportan que la MI en sementales Criollo se mantiene constante durante todo el año (Primavera  $80.7 \pm 6$ , Verano  $82.9 \pm 6$ , Otoño  $83.5 \pm 6$  e Invierno  $84.9 \pm 6$  %), mientras que en sementales provenientes de razas europeas, la motilidad disminuye en la época más calurosa (Primavera  $83.9 \pm 9$ , Verano  $62.3 \pm 9$ , Otoño  $58.4 \pm 9$  e Invierno  $85.15 \pm 9$  %). Las medias para motilidad individual fueron menores que las reportadas por Quezada-Casasola *et al.* (2016); sin embargo,



Cuadro 3. Medias  $\pm$  error estándar de la motilidad individual y grupal del semen de bovinos Criollo y Europeo en invierno y verano

Motilidad	Invierno		Verano		E.E
	Europeo	Criollo	Europeo	Criollo	
Individual	78.8 <sup>a</sup>	72.2 <sup>a</sup>	76.6 <sup>a</sup>	64.4 <sup>a</sup>	$\pm$ 4.3
Grupal	76.6 <sup>a</sup>	71.1 <sup>b</sup>	77.7 <sup>a</sup>	58.88 <sup>c</sup>	$\pm$ 2.8

<sup>a, b, c</sup>, Literales distintas significan diferencia ( $P < 0.05$ ) entre columnas



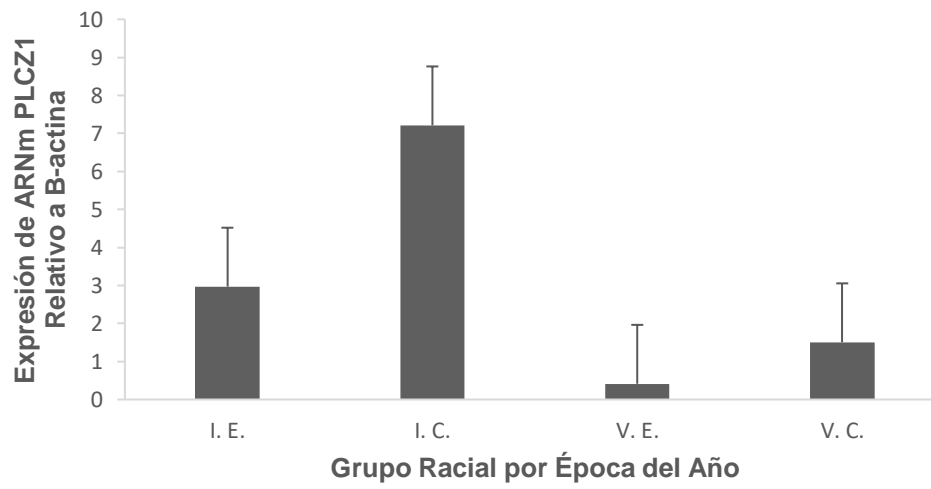
Grafica 1 Medias  $\pm$  error estándar de la motilidad grupal del semen de bovinos Criollo y Europeo en invierno y verano.

ésto se puede explicar por el nivel nutricional que tenían los animales, ya que los animales utilizados por estos autores se encontraban estabulados, con una dieta balanceada, mientras que los animales del presente estudio se encontraban en el agostadero y bajo un sistema de bajos insumos, similar a los toros del estudio realizado por Villatoro-Salinas *et al.* (2016).

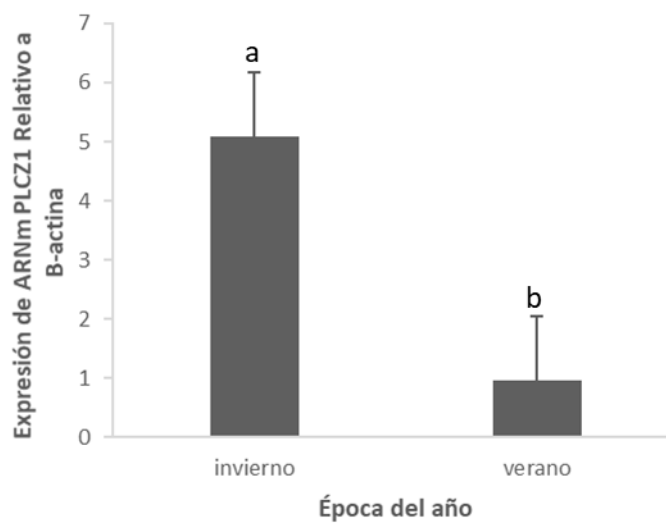
Por otra parte, la baja MG obtenida en los sementales Criollo en la época de verano se pudo deber a una omisión en limpieza requerida al momento del muestreo, ya que, el prepucio se encontraba más sucio, y al eyacular retraen más el pene, eyaculando dentro del prepucio, pues se observó que la muestra se obtuvo un poco contaminada.

**Expresión de *PLCZ1*.** Los resultados sobre los niveles de expresión de ARNm *PLCZ1* en células espermáticas de bovino Criollo y Europeo en las dos épocas del año se presentan en la Gráfica 2. No se encontró efecto de la interacción de raza por época; sin embargo, en la Gráfica 3, se muestra que hubo una diferencia ( $p < 0.05$ ) en la expresión de *PLCZ1* por efecto de época, siendo esta mayor en la época de invierno que en verano ( $5.09 \pm 1.09$  vs  $0.959 \pm 1.09$ ). Además, en la Gráfica 4 se logra apreciar una diferencia entre razas, aunque no significativa ( $P = 0.12$ ), siendo mayor la expresión en los sementales Criollo Chihuahuense  $4.36 \pm 1.09$  que en los Europeo  $1.69 \pm 1.09$ .

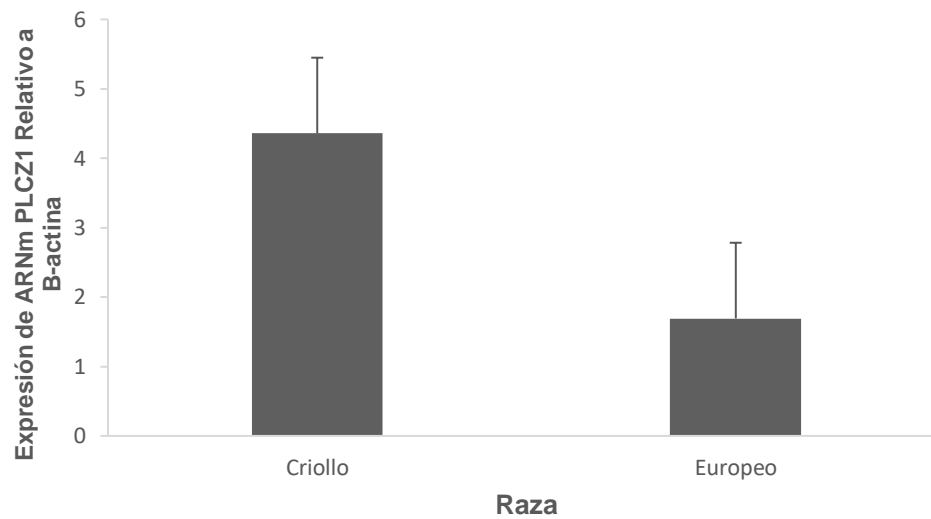
Existe evidencia de que la proteína *PLCZ1* es indispensable para desencadenar la activación del ovocito (Ramadan *et al.*, 2012; Kashir *et al.*, 2018) y que entre mayor sean los niveles de *PLCZ1* en los espermatozoides mayor será



Gráfica 2. Nivel de expresión del ARNm *PLCZ1* relativo a  $\beta$ -actina por raza y época del año. Las barras muestran las medias  $\pm$  error estándar calculado con el método de  $2^{-\Delta CT}$ .



Grafica 3. Expresión del ARNm PLCZ1 relativo a B-actina en las dos épocas del año. Las barras muestran las medias  $\pm$  error estándar calculado con el método de  $2^{-\Delta CT}$ . Literales diferentes indican diferencia ( $p < 0.05$ ) entre medias de época.



Grafica 4. Expresión del ARNm PLCZ1 relativo a B-actina en los dos grupos raciales. Las barras muestran las medias  $\pm$  error estándar calculado con el método de  $2^{-\Delta CT}$ .

el porcentaje de fertilización del ovocito (Kasimanickam *et al.*, 2012; Atabay *et al.*, 2019).

Además, se ha reportado que existe una relación directa entre los niveles de ARNm y la proteína *PLCZ1*, de tal forma que la cantidad de transcritos en el espermatozoide puede ser un indicador de la fertilidad de los animales (Aghajanpour *et al.*, 2011; Atabay *et al.*, 2019), por lo que es muy importante detectar sementales con esta característica.

Como se observa en la Gráfica 3, se encontró una gran diferencia en los niveles de expresión relativa de *PLCZ1* por época del año, siendo 5.3 veces más alto en el invierno que en el verano. Esta diferencia se puede deber al nivel de nutrición de los animales ya que la nutrición tiene un gran impacto en la expresión génica en todos los tejidos y tipos celulares, incluyendo los espermatozoides. Por ejemplo, se ha reportado que la suplementación con vitaminas y minerales tiene un gran efecto en la expresión de diversos genes (Lin *et al.*, 2017; Venkata Krishnaiah *et al.*, 2019). En un estudio en el que se evaluó la expresión de distintos genes de interés reproductivo en espermatozoides de ratones, incluido *PLCZ*, por medio de qPCR, encontraron que la suplementación en ratones con extracto de algarrobo aumentó 0.36 y 0.33 veces la expresión de *PLCZ* a los 21 y 35 días de suplementación (ElAkhdar *et al.*, 2020). La disponibilidad de forraje en el año de estudio fue mucho mayor durante la época de invierno, por lo que ésto pudo haber influido sobre los niveles de expresión de *PLCZ1*.

Se ha reportado que, en los espermatozoides de los mamíferos existen diferentes tipos de ARNs y otras moléculas que son entregadas al ovocito junto con el ADNg paterno (Boerke *et al.*, 2007; Selvaraju *et al.*, 2017). La función de

algunos de estos ARNs ha sido demostrada de manera experimental en ciertas especies (Aghajpour *et al.*, 2011; Atabay *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020), sin embargo, hay mucho por investigar. Franco *et al.* (2020) utilizaron ocho toros, los cuales cumplían con los criterios de calidad convencional necesarios para llevar a cabo la fertilización por la técnica de inseminación artificial. Al inseminar diferente número de vacas por toro obtuvieron un 52 % de preñez a los 24 d post inseminación. A los 31 d de preñez habían tenido una pérdida embrionaria del 5.5 % y a los 60 d disminuyó de nuevo el número de vacas preñadas de un 46.5 % a un 39.8 %. Estas pérdidas embrionarias o fetales fueron evidentes sólo en las vacas inseminadas por ciertos toros, ya que, no se encontró una relación en las pérdidas embrionarias o fetales relacionadas con el corral o edad de la vaca gestante. Esto indica que los espermatozoides pueden contener expresión de ciertos genes que ayuden en la sobrevivencia del embrión durante los días más críticos.

Atabay *et al.* (2019) evaluaron un gran grupo de búfalos de agua bajo las mismas condiciones, encontrando que la expresión de ARNm *PLCZ1* por individuo era diferente a pesar de encontrarse en el mismo lugar y siendo individuos de la misma raza.

En la Gráfica 4 se observa que los toros Criollo chihuahuense tendieron a tener niveles de expresión de ARNm *PLCZ1* más altos en comparación con los toros provenientes de razas europeas. Esto coincide con lo reportado en párrafos anteriores, donde se ve que los niveles de expresión pueden variar de acuerdo al individuo, a la alimentación y al genotipo. Como se mencionó en la sección de revisión de literatura el ganado Criollo Chihuahuense tiene una distribución y



hábitos de pastoreo diferentes al europeo (Sheehy, 2007; Roacho-Estrada, 2008; Spiegel *et al.*, 2019) por lo que su nivel de nutrición podría cambiar de acuerdo a este tipo de comportamiento. Resulta interesante que a pesar de que la motilidad grupal del semen Criollo fue más baja que la del semen de toros Europeo, los niveles de expresión de ARNm *PLCZ1* tienden a ser más altos en Criollo en las dos épocas del año evaluadas. Estos resultados sugieren la necesidad de medir los niveles de ARNm *PLCZ1* en los espermatozoides de un mayor número de animales para relacionarlos con la preñez exitosa en las vacas y encontrar una posible explicación a los resultados obtenidos por Diaz *et al.* (2015) al reportar una cosecha de becerros del 91 % en el ganado criollo y el 85 % en el ganado europeo utilizando una relación vaca toro 30:1 y 16:1 respectivamente.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que la motilidad y cinemática espermática en las pruebas de fertilidad en los sementales son valores que deberían ser complementados con valores moleculares, ya que, a pesar de tener motilidades y cinemática similares pudieran no presentar el mismo patrón de expresión de ARNm *PLCZ1*. Esta diferencia en la expresión de ARNm *PLCZ1* puede estar presente no sólo por épocas, sino también por grupo racial, por lo que es necesario realizar más trabajos en el futuro.

Se recomienda realizar un estudio de pastoreo para determinar diferencias especie específicas en las dietas de éstos grupos raciales, así como también evaluar sementales en un sistema estabulado para descartar el factor de alimentación y conocer la diferencia en este sistema, sabiendo que la mayoría de las pajillas obtenidas para inseminación artificial se obtienen en un sistema de este tipo.

Esta investigación será la base para nuevas investigaciones con un mayor número de animales, donde se pueda monitorear el porcentaje de preñez en estudios en campo o porcentaje de blastocitos en producción de embriones *in vitro* y relacionarlo con los niveles de ARNm *PLCZ1*.

## LITERATURA CITADA

- Aghajanpour, S., K. Ghaedi, A. Salamian, M. R. Deemeh, M. Tavalae, J. Moshtagian, J. Parrington, and M. H. Nasr-Esfahani. 2011. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. *Hum. Reprod.* 26:2950–2956.
- Al-Gazl, M. K., and M. Carroll. 2016. Sperm-Specific MicroRNAs - Their Role and Function. *Genet. Genomic Sci.* 1:1–4.
- De Alba-Martínez, J. 2011. *El Libro de los Bovinos Criollos de América*. 1st ed. (S. A. de C. V. Ediciones Papiro omega, editor.).
- De Alba, J. 1981. Resistencia a enfermedades y adaptación de ganados criollos de América al ambiente tropical. In: B. Müller-haye and J. Gelman, editors. *Recursos genéticos animales en américa latina. Ganado criollo y especies de altura*. 22nd ed. Roma, Italia.
- Anderson, D. M., R. E. Estell, A. L. Gonzalez, A. F. Cibils, and L. A. Torell. 2015. Criollo cattle: Heritage Genetics for Arid Landscapes. *Rangelands*. 37:62–67.
- Atabay, E. P., Z. P. Fajardo, R. D. Tadeo, E. C. Atabay, E. V. Venturina, C. N. Mingala, and R. A. Fissore. 2019. Phospholipase C zeta 1 mRNA as a marker of oocyte-activation and fertilization potential of water buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Livest. Sci.* 225:103–108.
- Avendaño, C., A. Franchi, E. Jones, and S. Oehninger. 2009. Pregnancy-specific -1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum. Reprod.* 24:270–277.
- Barratt, C. L., S. Mansell, C. Beaton, S. Tardif, and S. K. Oxenham. 2011. Diagnostic

- tools in male infertility—the question of sperm dysfunction. *Asian J. Androl.* 13:53–58.
- Bedford-Guaus, S. J., S.-Y. Yoon, R. A. Fissore, Y.-H. Choi, and K. Hinrichs. 2008. Microinjection of mouse phospholipase C $\zeta$  complementary RNA into mare oocytes induces long-lasting intracellular calcium oscillations and embryonic development. *Reprod. Fertil. Dev.* 20:875.
- Berridge, M. J. 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793:933–940.
- Boerke, A., S. J. Dieleman, and B. M. Gadella. 2007. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology.* 68:S147–S155.
- Carvajal-Serna, M., H. A. Cortés-López, C. Manrique-Perdomo, and H. A. Grajales-Lombana. 2017. Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Rev. Med. Vet. (Bogota).* 49–61.
- Dadoune, J.-P., J.-P. Siffroi, and M.-F. Alfonsi. 2004. Transcription in Haploid Male Germ Cells. In: p. 1–56.
- Diaz, J., L. A. Torell, A. Gonzalez, R. Estell, A. F. Cibilis, and D. M. Anderson. 2015. The economics of Raramuri Criollo (RC) versus British crossbred cattle production in the Chihuahuan desert. 68th Annu. Soc. Range Manag. Meet. Sacramento, CA. 31.
- Du, Y., X. Wang, B. Wang, W. Chen, R. He, L. Zhang, X. Xing, J. Su, Y. Wang, and Y. Zhang. 2014. Deep sequencing analysis of microRNAs in bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 81:1042–1052.
- Duarte, O. A. 1997. El Ganado Criollo mexicano un recurso que se debe preservar. 1st

- ed. Ediciones Pecuarias de México, México.
- EIAkhdar, N., R. Bawab, and J. Borjac. 2020. Effect of ceratonia siliqua and cucurbita pepo seeds extracts on spermatogenesis in male mice. *Heal. Wellbeing*. 3:1–12.
- Fair, S., and P. Lonergan. 2018. Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. *Animal*. 12:s53–s62.
- Fierro, L. C. 1995. *Apuntes Históricos sobre la Ganadería de Chihuahua*. 2nd ed. Chihuahua, México.
- Fierro, L. C., and L. D. Pamanes. 1998. *El Ganado de Rodeo en el Estado de Durango. Memorias del Segundo Foro de Análisis de Recursos Genéticos: “Ganado Criollo” Hacia el establecimiento del programa Nacional de Recursos Genéticos Pecuarios*. Chihuahua, México.
- Franco, G., S. Reese, R. Poole, J. Rhinehart, K. Thompson, R. Cooke, and K. Pohler. 2020. Sire contribution to pregnancy loss in different periods of embryonic and fetal development of beef cows. *Theriogenology*. 154:84–91.
- Fullston, T., E. M. C. Ohlsson-Teague, C. G. Print, L. Y. Sandeman, and M. Lane. 2016. Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring’s Sperm. C. Ovilo, editor. *PLoS One*. 11:e0166076.
- Hachem, A., J. Godwin, M. Ruas, H. C. Lee, M. Ferrer Buitrago, G. Ardestani, A. Bassett, S. Fox, F. Navarrete, P. de Sutter, B. Heindryckx, R. Fissore, and J. Parrington. 2017. PLC $\zeta$  is the physiological trigger of the Ca<sup>2+</sup> oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development*. 144:2914–2924.
- Holgado, F. D., and M. F. Ortega. 2019. *Caracterización productiva del bovino criollo*

- argentino: período 2006-2016. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Hormay, A. L. 1956. How Livestock Grazing Habits and Growth Requirements of Range Plants Determine Sound Grazing Management. *Rangel. Ecol. Manag. Range Manag. Arch.* 9(4):161–164.
- Kashir, J., M. Nomikos, and F. A. Lai. 2018. Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. *Adv. Biol. Regul.* 67:148–162.
- Kasimanickam, V., R. Kasimanickam, A. Arangasamy, A. Saberivand, J. S. Stevenson, and J. P. Kastelic. 2012. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology.* 78:2007-2019.
- Kathiravan, P., J. Kalatharan, G. Karthikeya, K. Rengarajan, and G. Kadirvel. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reprod. Domest. Anim.* 46:165–172.
- Kleene, K. C. 2001. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech. Dev.* 106:3–23.
- Kropp, J., J. A. Carrillo, H. Namous, A. Daniels, S. M. Salih, J. Song, and H. Khatib. 2017. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genomics.* 18:280.
- De la Torre, R. 1981. La Reproducción de las Razas Criollas. In: B. Müller-Haye and J. Gelman, editors. *Recursos genéticos animales en américa latina, ganado criollo y especies de altura.* Roma, Italia. p. 109–113.
- Lin, Y., G. Lv, H.-J. Dong, D. Wu, Z.-Y. Tao, S.-Y. Xu, L.-Q. Che, Z.-F. Fang, S.-P. Bai,

- B. Feng, J. Li, and X.-Y. Xu. 2017. Effects of the different levels of dietary vitamin D on boar performance and semen quality. *Livest. Sci.* 203:63–68.
- McTavish, E. J., J. E. Decker, R. D. Schnabel, J. F. Taylor, and D. M. Hillis. 2013. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:E1398-406.
- Müller, M., and S. Kersten. 2003. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat. Rev. Genet.* 4:315–322.
- Nomikos, M., J. Kashir, and F. A. Lai. 2017. The role and mechanism of action of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation. *Biochem. J.* 474:3659–3673.
- Nyamuryekung'e, S., A. F. Cibilis, R. E. Estell, M. McIntosh, D. VanLeeuwen, C. Steele, A. L. Gonzalez, S. Spiegel, L. Avedaño-Reyes, F. A. Rodríguez-Almeida, and M. Anderson. 2021. Foraging behavior and body temperature of heritage vs. commercial beef cows in relation desert ambient heat. *J. Arid Environ.*
- Ormachea, E., B. Calsin, and E. Zegarra. 2019. Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Awiss. *Rev Inv Vet Perú.* 30 (1):500–506.
- Paronetto, M. P., and C. Sette. 2010. Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 33:2–12.
- Parthipan, S., S. Selvaraju, L. Somashekar, A. P. Kolte, A. Arangasamy, and J. P. Ravindra. 2015. Spermatozoa input concentrations and RNA isolation methods on RNA yield and quality in bull (*Bos taurus*). *Anal. Biochem.* 482:32–39.
- Pauler, C. M., J. Isselstein, T. Braunbeck, and M. K. Schneider. 2019. Influence of Highland and production-oriented cattle breeds on pasture vegetation: A pairwise assessment across broad environmental gradients. *Agric. Ecosyst. Environ.*

284:106585.

Peinetti, H. R., E. L. Fredrickson, D. P. C. Peters, A. F. Cibilis, J. O. Roacho-Estrada, and A. S. Laliberte. 2011. Foraging behavior of heritage versus recently introduced herbivores on desert landscapes of the American Southwest. *Ecosphere*. 2:art57.

Quezada-Casasola, A., L. Avendaño-Reyes, U. Macías-Cruz, J. A. Ramírez-Godínez, and A. Correa-Calderón. 2014. Estrus behavior, ovarian dynamics, and progesterone secretion in Criollo cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:675–684.

Quezada-Casasola, A., K. E. Martínez-Armendáriz, J. M. Carrera-Chávez, E. Pérez-Eguía, C. A. Rodríguez-Alarcón, and L. Avendaño-Reyes. 2016. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics and testosterone serum concentration in Mexican Corriente and other beef breed bulls. *Anim. Reprod.* 13:787–794.

Quintero-Moreno, A., J. M. Mayorga-Torres, and W. Maya-Cardona. 2017. El Análisis Seminal como Herramienta para Predecir el Potencial Reproductivo en Toros. *J. Vet. Androl.* 2(1):30–37.

Ramadan, W. M., J. Kashir, C. Jones, and K. Coward. 2012. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun. Signal.* 10:12.

Riley, D. G., C. C. J. Chase, S. W. Coleman, and T. A. Olson§. 2014. Evaluation of the Criollo breed Romosinuano as purebred and crossbred cows with Brahman and Angus in Florida: I. Reproduction and parturition. *J. Anim. Sci.* 92:1902–1910.

Ríos-Ramírez, J. G. 2019. Conservación, desarrollo y productividad del ganado Criollo



- mexicano de la sierra de Chihuahua. In: Libro de Actas XII Congreso de la Federación Iberoamericana de Razas Criollas y Autóctonas Ciclo Internacional De Conferencias Dr. Jorge De Alba. Veracruz, México. p. 114–122.
- Roacho-Estrada, J. O. 2008. Uso de hábitat por ganado criollo mexicano vs ganado europeo en ambientes de Nuevo Mexico y Chihuahua. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Roacho-Estrada, J. O., E. L. Fredrickson, G. A. Bezanilla-Enríquez, A. L. González, H. R. Peinetti, and F. A. Rodríguez-Almeida. 2009. Habitat use by Mexican criollo and British beef cattle breeds in arid- and semi-arid environments of New Mexico and Chihuahua. *Ecol. Soc. Am.* 94th Annu. Meet. 15–9.
- Rouse, J. E. 1977. *The Criollo: Spanish cattle in the Americas*. 1st ed. University of Oklahoma Press., Norman, USA.
- Russell, N. D., J. Rios, G. Erosa, M. D. Remmenga, and D. E. Hawkins. 2000. Genetic differentiation among geographically isolated populations of Criollo cattle and their divergence from other *Bos taurus* breeds. *J. Anim. Sci.* 78:2314.
- Salazar, J. J., and A. Cardozo. 1981. *Desarrollo del Ganado Criollo en América Latina. Resumen histórico y distribución actual. Recursos genéticos de animales en América Latina*. In: *Recursos genéticos animales en américa latina, ganado criollo y especies de altura*. 22nd ed. Roma, Italia. p. 8–12.
- Saleh, A., J. Kashir, A. Thanassoulas, B. Safieh-Garabedian, F. A. Lai, and M. Nomikos. 2020. Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Sarıözkan, S., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, S. Büyükleblebici, A. Eken, and C. Akay. 2015. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of

- Holstein bull semen. *Cryobiology*. 71:119–124.
- Saunders, C. M., M. G. Larman, J. Parrington, L. J. Cox, J. Royse, L. M. Blayney, K. Swann, and F. A. Lai. 2002. PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129 (15):3533–3544.
- Saunders, C. M., K. Swann, and F. A. Lai. 2007. PLC $\zeta$ , a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem. Soc. Symp.* 74:23.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108.
- Selvaraju, S., S. Parthipan, L. Somashekar, A. P. Kolte, B. Krishnan Binsila, A. Arangasamy, and J. P. Ravindra. 2017. Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Sci. Rep.* 7:42392.
- Sharma, M., M. Singh, A. Sharma, and P. Kumar. 2016. Correlation between semen evaluation parameters and fertility of frozen-thawed semen of Jersey  $\times$  local hill cattle crossbred bulls. *Indian J. Anim. Reprod.* 37 (1):52–54.
- Sheehy, C. M. 2007. Comparison of spatial distribution and resource use by Spanish and British breed cattle in Northeastern Oregon prairie ecosystems. Oregon State University.
- Singh, B., G. Mal, S. K. Gautam, and M. Mukesh. 2019. Stem Cells and Cellular Reprogramming to Advance Livestock Industry. In: *Advances in Animal Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham. p. 215–226.
- Spiegel, S., R. E. Estell, A. F. Cibils, D. K. James, H. R. Peinetti, D. M. Browning, K. B. Romig, A. L. Gonzalez, A. J. Lyons, and B. T. Bestelmeyer. 2019. Seasonal Divergence of Landscape Use by Heritage and Conventional Cattle on Desert Rangeland. *Rangel. Ecol. Manag.* 72:590–601.

- Sundararaman, M., J. Kalatharan, and K. Jawahar. 2012. Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. *Vet. World.* 5:723.
- Valcarce, D. G., F. G. Gonzalez, E. S. Álvarez, Á. J. L. Martínez, and V. R. Rodríguez. 2018. La importancia de la contribución paterna en el desarrollo embrionario: los ARN espermáticos. *Ambiociencias.* 10:52–63.
- Valdez-Torres, J. M. 2018. Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Vargas Hernández, J. E. 2016. Nutrigenómica humana: efectos de los alimentos o sus componentes sobre la expresión RNA. *Rev. la Fac. Med.* 64:339.
- Venkata Krishnaiah, M., A. Arangasamy, S. Selvaraju, P. R. Guvvala, and K. Ramesh. 2019. Organic Zn and Cu interaction impact on sexual behaviour, semen characteristics, hormones and spermatozoal gene expression in bucks (*Capra hircus*). *Theriogenology.* 130:130–139.
- Villa, C. E. 2010. El concepto de rusticidad. *Rev. Hereford.* 38–39.
- Villaseñor González, F., J. F. De la Torre Sánchez, G. Martínez Velázquez, H. Álvarez Gallardo, S. Pérez Reynozo, J. A. Palacios Fránquez, R. Polanco Sojo, and M. Montaña Bermúdez. 2017. Caracterización de la respuesta ovárica a la superovulación en bovino Criollo Coreño utilizando dosis reducidas de FSH. *Rev. Mex. Ciencias Pecu.* 8:225.
- Villatoro-Salinas, R. J., A. Rosendo-Ponce, R. Canseco-Sedano, C. Cortez-Romero, G. Torres-Hernández, F. Rosales-Martínez, and C. M. Becerril-Pérez. 2016. Seminal characteristics of Tropical Milking bulls in two seasons in Veracruz, Mexico.

Zootec. Trop. 34 (4):301–308.

Wilkins, J. V. 1984. CRIOLLO CATTLE OF THE AMERICAS. Anim. Genet. Resour. Inf. 2:1–19.

Yan, Zheng, Y. Fan, F. Wang, Zhiguang Yan, M. Li, J. Ouyang, L. Wu, M. Yin, J. Zhao, Y. Kuang, B. Li, and Q. Lyu. 2020. Novel mutations in PLCZ1 cause male infertility due to fertilization failure or poor fertilization. Hum. Reprod. 35:472–481.

Zemjanis, R. 1987. Reproducción animal diagnóstico y técnicas terapéuticas. 1st ed. (Limusa, editor.). México, D.F.