

R-174 Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 262-263, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc111>**Extracellular vesicles (EVs) in seminal plasma of buffalo bulls possess spermatozoa specific fertility associated proteins and enzymes****Rakesh Kumar*, Mir Ahmad, Bala Subramaniam, Ankit Pal, Aditya Patel, Shiva Shiva, Vitika Chauhan, Seema Karanwal, Mukesh Bhakat, Tirtha K. Datta**

ICAR- National dairy Research Institute, Karnal, Haryana, INDIA

*Corresponding author: Rakesh Kumar (rakesh.kumar@icar.gov.in).**ABSTRACT**

Buffaloes are the backbone of the Indian dairy and live-stock industry. They contribute nearly 53% of milk and 30% of meat production in India. Bull fertility is vital to productivity, sustainability, and efficient buffalo farming. The current study aims

Las vesículas extracelulares (EV) en el plasma seminal de los toros búfalo poseen proteínas y enzimas asociadas a la fertilidad específicas de los espermatozoides

Rakesh Kumar*, Mir Ahmad, Bala Subramaniam, Ankit Pal, Aditya Patel, Shiva Shiva, Vitika Chauhan, Seema Karanwal, Mukesh Bhakat, Tirtha K. Datta

ICAR- Instituto Nacional de Investigación Láctea, Karnal, Haryana, INDIA

*Autor de correspondencia: Rakesh Kumar (rakesh.kumar@icar.gov.in).**RESUMEN**

Los búfalos son la columna vertebral de la industria ganadera y láctea de la India. Contribuyen con casi el 53% de la producción de leche y el 30% de la producción de carne en

to assess the extracellular vesicles (EVs) based fertility marker in the seminal plasma of buffalo bulls. The seminal plasma of buffalo bulls of contrasting fertility was utilized to purify EVs by size exclusion chromatography (SEC). Diffraction light scattering (DLS), nano-tracking assay (NTA), and Western blotting were used to confirm seminal plasma EVs. A pure population of EVs was obtained in 7-12 SEC fractions with an average EV size of 161nm. The NTA analysis provides a quantitative abundance of EVs, and the EVs population was 1.5×10^9 to 2.9×10^{11} EVs/ml in seminal plasma. Utilizing the Western blotting approach, the abundance of SPAM-1 protein in EVs was significantly high in high fertile (HF) bulls as compared to low fertile (LF) group ($p < 0.05$). However, disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 7 (ADAM-7) and acrosomal protein SP-10 were not significantly different in seminal EVs of HF and LF bulls. Similarly, the abundance of Galectin-3 and aldose reductase (AR) was comparatively higher in HF groups, although it was insignificant. The fertility factor, CD9 protein, was significantly abundant in the seminal EVs of HF vis a vis LF buffalo bulls, suggesting that CD9 of seminal EVs origin could help assess the fertility status of buffalo bulls. Enzymatic phospholipase A2 (PLA2) activity in HF was higher than in LF seminal EVs, indicating superior PLA2 activity in highly fertile bull semen. Uptake of EV-associated fertility proteins by spermatozoa was assessed. We observed that protein cargo was successfully assimilated with sperm. Finally, LC-MS/MS-based high throughput proteome was performed to identify the differential abundance of protein cargo in seminal EVs of contrasting fertility bulls. We identified the top twenty differently abundant proteins in seminal EVs of HF bulls *vis-à-vis* LF bulls. The identified proteins were strongly related to sperm functions. Thus, the present study supports that buffalo seminal EVs possess vital fertility-associated proteins and enzymes, which could be important markers for assessing buffalo bull fertility.

Keywords: extracellular vesicles, seminal plasma, fertility, protein.

la India. La fertilidad de los toros es vital para la productividad, la sostenibilidad y la cría eficiente de búfalos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el marcador de fertilidad basado en vesículas extracelulares (EV) en el plasma seminal de toros búfalinos. El plasma seminal de búfalos de fertilidad contrastante se utilizó para purificar vesículas extracelulares mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se utilizaron dispersión de luz por difracción (DLS), ensayo de nanoseguimiento (NTA) y Western Blot para confirmar las EV del plasma seminal. Se obtuvo una población pura de vesículas extracelulares en fracciones de 7 a 12 SEC con un tamaño de vesículas extracelulares promedio de 161 nm. El análisis NTA proporciona una abundancia cuantitativa de EV, y la población de EV fue de $1,5 \times 10^9$ a $2,9 \times 10^{11}$ EV/ml en plasma seminal. Utilizando el método de transferencia Western, la abundancia de la proteína SPAM-1 en las vesículas extracelulares fue significativamente alta en los toros de alta fertilidad (HF) en comparación con los del grupo de baja fertilidad (LF) ($p < 0,05$). Sin embargo, la proteína 7 que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteinas (ADAM-7) y la proteína acrosómica SP-10 no fueron significativamente diferentes en las EV seminales de toros HF y LF. De manera similar, la abundancia de Galectina-3 y aldosa reductasa (AR) fue comparativamente mayor en los grupos con HF, aunque fue insignificante. El factor de fertilidad, la proteína CD9, fue significativamente abundante en las vesículas extracelulares seminales de los toros búfalo HF en comparación con los búfalos LF, lo que sugiere que el CD9 de origen de las vesículas extracelulares seminales podría ayudar a evaluar el estado de fertilidad de los búfalos. La actividad enzimática de la fosfolipasa A2 (PLA2) en HF fue mayor que en las EV seminales de LF, lo que indica una actividad de PLA2 superior en semen de toro altamente fértil. Se evaluó la absorción de proteínas de fertilidad asociadas a EV por parte de los espermatozoides. Observamos que la carga proteica fue asimilada exitosamente por los espermatozoides. Finalmente, se realizó un proteoma de alto rendimiento basado en LC-MS/MS para identificar la abundancia diferencial de la carga de proteínas en vesículas extracelulares seminales de toros de fertilidad contrastante. Identificamos las veinte proteínas con abundancia diferente en las vesículas extracelulares seminales de toros HF frente a toros LF. Las proteínas identificadas estaban fuertemente relacionadas con las funciones de los espermatozoides. Por lo tanto, el presente estudio respalda que las vesículas extracelulares seminales de búfalos poseen proteínas y enzimas vitales asociadas a la fertilidad, que podrían ser marcadores importantes para evaluar la fertilidad de los búfalos.

Palabras clave: vesículas extracelulares, plasma seminal, fertilidad, proteínas.