



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**DETECCIÓN DE DAÑO OXIDATIVO Y  
ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN LA  
CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO**

**DETECTION OF OXIDATIVE DAMAGE AND  
EPIGENETIC ALTERATIONS IN SWINE SPERM  
CHROMATIN**

Paula Arce López

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Junio, 2020**

**FIRMA DEL ALUMNO**

A handwritten signature in black ink, reading "Paula Arce". The signature is written in a cursive style with a long horizontal line extending to the right from the end of the name.

Fdo.: Paula Arce López

En León, a 30 de junio de 2020

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	1
<b>3. CONTEXTO ECONÓMICO DEL SECTOR PORCINO</b> .....	2
<b>4. LA CROMATINA ESPERMÁTICA</b> .....	4
<b>5. LA IMPORTANCIA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA Y SUS ALTERACIONES EN FERTILIDAD</b> .....	6
5.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	7
5.2. ESTRÉS OXIDATIVO .....	10
5.3. DAÑO EN EL ADN .....	11
5.4. REDUCCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO.....	12
<b>6. LAS HISTONAS EN EL ADN ESPERMÁTICO Y SUS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS</b> .....	12
<b>7. MÉTODOS TRADICIONALES PARA EL ESTUDIO DEL ADN ESPERMÁTICO</b> .....	14
7.1. SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) .....	15
7.2. TUNEL.....	15
7.3. COMET.....	16
7.4. SPERM CHROMATIN DISPERSION TEST (SCD) .....	16
<b>8. MÉTODOS NOVEDOSOS PARA EL ESTUDIO DEL ADN ESPERMÁTICO</b> 17	
8.1. DETECCIÓN DE 8-OHdG .....	18
8.2. DETECCIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS: METILACIÓN Y ACETILACIÓN DE HISTONAS .....	21
<b>9. PERSPECTIVAS PARA LA APLICACIÓN DE ESTAS TÉCNICAS EN GANADO PORCINO Y BENEFICIOS</b> .....	24
<b>10. CONCLUSIÓN</b> .....	25
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	26

## RESUMEN

El ganado porcino tiene una gran importancia económica, y depende en gran medida de la utilización de la inseminación artificial. El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre métodos novedosos basados en biomarcadores que permitan optimizar la detección temprana de daños en el ADN espermático de cerdo. Diversos estudios han establecido una alta correlación entre la calidad del ADN espermático y la fertilidad de las muestras utilizadas en la reproducción asistida en especies porcinas. Los métodos clásicos de evaluación de muestras de semen (SCSA, COMET, TUNEL, etc.) en muchas ocasiones no proporcionan datos fiables sobre la calidad del ADN. Esto ha impulsado la búsqueda de novedosas técnicas inmunoquímicas basadas en biomarcadores oxidativos como los aductos de 8-OHdG y modificaciones epigenéticas (acetilaciones y metilaciones) en histonas que permitan una temprana detección de ADN espermático de baja calidad, ya que se considera la causa principal de la infertilidad y los tamaños reducidos de las camadas. Los avances en este campo supondrán grandes beneficios económicos para el sector porcino.

**Palabras clave:** alteraciones epigenéticas, cromatina, daño espermático, daño oxidativo, espermatozoide porcino, histonas.

## ABSTRACT

Swine livestock is economically important, and highly depends on the use of artificial insemination. The main goal of this work is to carry out a bibliographic review on novel biomarker-based methods that allow the optimization of early DNA damage detection in swine chromatin. Several studies have established a high correlation between the quality of sperm DNA and the fertility of the samples used in assisted reproduction techniques in porcine species. The classical methods of evaluation of semen samples (SCSA, COMET, TUNEL...) do not often provide reliable data on DNA quality. This has boosted the search for novel immunochemical techniques based on oxidative biomarkers such as 8-OHdG adducts and epigenetic modifications (acetylations and methylations) in histones that allow early and genuine detection of low-quality sperm DNA, since it is considered the main cause of infertility and reduced litter sizes. Advances in this field will bring great economic benefits to the porcine sector.

**Keywords:** chromatin, epigenetic alterations, histone, oxidative damage, sperm damage, swine sperm.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

IA: Inseminación artificial.

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PTM: Modificaciones post-traduccionales.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

PUFA: Ácidos grasos polinsaturados.

ATP: Adenosín trifosfato.

4-HNE: 4-hidroxinenal.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

AOX: Compuestos orgánicos halogenados.

DNMT: Histona-metiltransferasas.

SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay.

AO: Naranja de acridina.

DFI: Índice de fragmentación del ADN.

%DFI: Porcentaje de ADN fragmentado.

SCD: Sperm Chromatin Dispersion test.

8-OHGua: C8-hydroxyguanina.

8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina.

BER: Vía de reparación de escisión de bases.

LF: Baja fertilidad.

HF: Alta fertilidad.

DP: Doble positivo.

US: Sin teñir.

HDS: Índice de inmadurez de la cromatina.

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria porcina es clave en la economía española, y actualmente también en los mercados externos. Dada su importancia, el incremento de la producción porcina ha ido acompañado de innovación tecnológica y mejora del manejo y bienestar de los animales. El principal objetivo que lo justifica es la necesidad de abastecimiento de la especie humana con alimentos y nutrientes de alto valor (Didion *et al.*, 2009).

En el contexto de la innovación tecnológica, surgen novedosos sistemas de detección de los individuos con mejores cualidades espermáticas, en contraposición con los sistemas tradicionales, que en algunas ocasiones no son óptimos para realizar esta selección. El uso de estas técnicas punteras eventualmente genera, en términos de inseminación artificial (IA), mayores producciones porcinas asociadas a un beneficio económico, ya que solo sería necesario el mantenimiento de aquellos animales con mejor potencial genético (Dyck *et al.*, 2011).

En los centros de cría se llevan a cabo técnicas rutinarias para la evaluación de movilidad, concentración, bacteriología y formas anormales. No obstante, estas técnicas no siempre permiten detectar a los individuos infértiles, y la detección temprana de individuos que van a dar resultados subóptimos tras la fecundación resultan en un gran desafío. (Dabrowska y Wiczowski, 2017). El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre métodos novedosos basados en biomarcadores que permitan optimizar la detección temprana de aquellos individuos con daños en el ADN, potencialmente relacionados con la infertilidad.

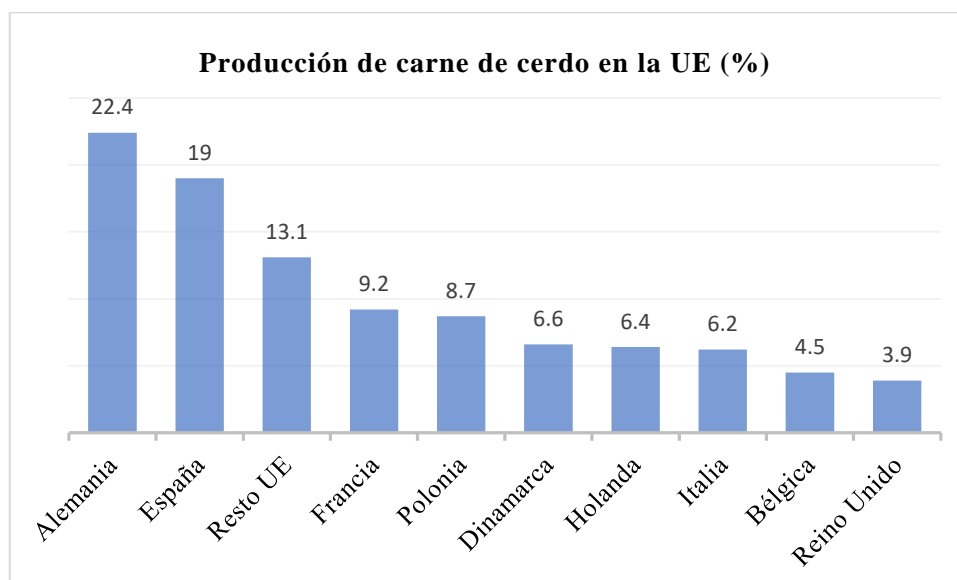
## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos recogidos en:

- El motor de búsqueda de libre acceso PubMed, de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- La base de datos ScienceDirect, de Elsevier: <https://www.sciencedirect.com/>
- El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), del Gobierno de España: <https://www.mapa.gob.es/es/>
- La base de datos de la Oficina Europea de Estadística: <https://ec.europa.eu/eurostat>
- La biblioteca *online* Wiley: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

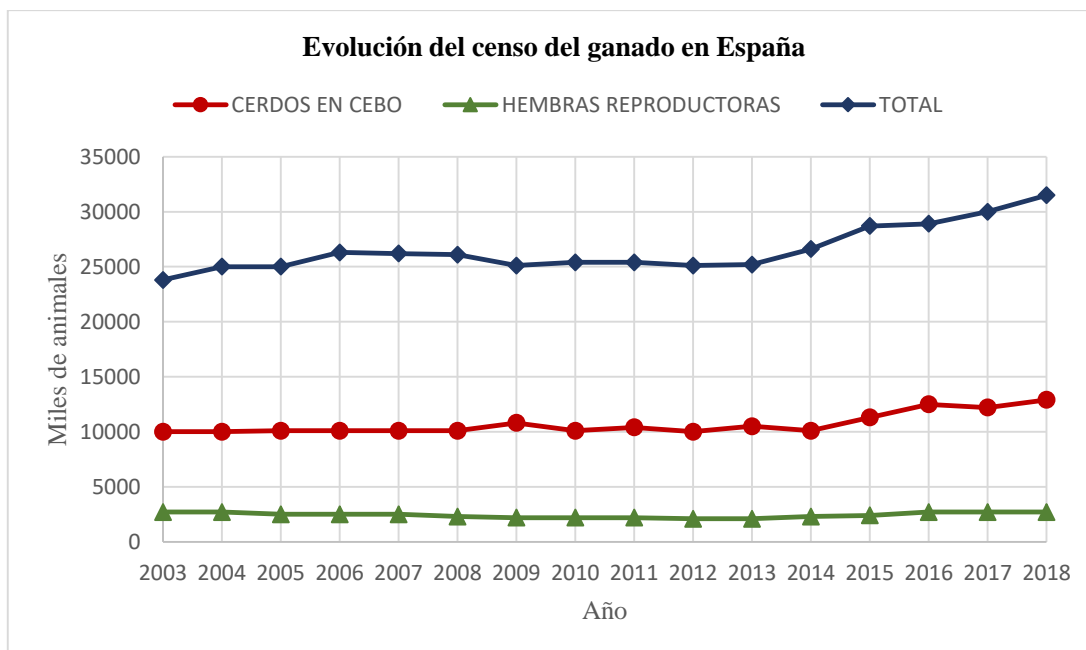
### 3. CONTEXTO ECONÓMICO DEL SECTOR PORCINO

El sector porcino en nuestro país es imprescindible para la economía, pues representa el 1,4% del PIB nacional (Interporc, 2018) y el 14% de la producción total agraria. Asimismo, en el ámbito ganadero, su importancia económica ronda el 39% de la producción total ganadera (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019b). Datos del año 2018 sitúan a España en cifras récord de producción porcina respecto a años anteriores, con 52,4 millones de animales sacrificados y 4,52 millones de toneladas de carne producida (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019a). España se sitúa en cuarta posición mundial en producción porcina, únicamente superado por China, Estados Unidos y Alemania. Centrándonos en la Unión Europea (UE), España ocupa el segundo lugar con un 19% de la producción (Gráfica 1), al acecho de Alemania que acapara el 22.4% (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019b).



**Gráfica 1:** Porcentaje de producción de carne de cerdo en los países de la Unión Europea durante el año 2018. Fuente: EUROSTAT.

En cuanto a los censos de poblaciones porcinas, España se encuentra en tercera posición mundial. En este ámbito, superó a Alemania en el año 2015. De manera análoga a la producción de carne, la población porcina en España ha sufrido un importante incremento en los últimos cinco años (Gráfica 2). El crecimiento se ha podido observar en todas las Autonomías nacionales, aunque han destacado principalmente Castilla La Mancha, Murcia, Aragón y Castilla y León (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019a).



**Gráfica 2:** Censo del ganado en España durante el periodo 2003-2018 desglosado en tipos de ganado. Fuente: SG Análisis, Coordinación y Estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).

Se debe destacar la creciente producción a nivel nacional durante los últimos cinco años, pues se ha incrementado casi un 4% (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2019a). Pese a no tener aún datos oficiales del año 2019 del MAPA, se estima que la producción y exportación porcina española haya aumentado notablemente respecto a años anteriores, cerrando el año con aproximadamente 3 millones de toneladas exportadas. Gran parte de este aumento se debe a la gran crisis sanitaria provocada por el brote de peste africana declarado el China (primera potencia mundial en ganado porcino), que ha causado que este país sufra una reducción de la producción ligada a la necesidad de importación de carne porcina de otros países (Agustina, 2019). Así, España se ha convertido en el segundo proveedor de carne porcina del país asiático (Gráfica 3), únicamente por detrás de Estados Unidos (Balanya, 2019).



**Gráfica 3:** Exportaciones de porcino españoles a China desde el año 2015 a principios de 2019. Se representan las medias mensuales de cada año de toneladas de carne exportada sin incluir animales vivos. Fuente: Federación Empresarial de Carnes e Industrias Cárnicas (FECIC).



A pesar de la creciente producción de ganado porcino en los últimos años, para finales del año 2020 se prevé una caída en la producción debido a la presente crisis sanitaria del coronavirus. Pese a que las granjas son consideradas como actividad esencial por el Real Decreto Ley 10/2020 publicado en el Boletín Oficial del Estado (BOE), estas han sufrido el cierre del sector de la hostelería durante el periodo de duración de la pandemia. De esta manera, la demanda de carne porcina por este sector va a caer considerablemente durante este año (Maté, 2020).

Asimismo, el precio de producción de sementales está aumentando, principalmente debido al coste de mantenimiento animal y la implementación de técnicas punteras en la industria de la IA, todo ello motivado por la importancia del sector porcino español en el mercado tanto nacional como internacional (Roca *et al.*, 2015). Este aumento se ve directamente reflejado en un aumento de precio por kilogramo de carne porcina viva durante el año 2019 en nuestro país.

Para evitar incrementos en la producción y venta, se requieren nuevas técnicas que permitan la rápida y temprana identificación de los individuos que produzcan el mejor semen para la industria de la IA. No solo por el potencial genético de estos individuos, sino porque, como se ha mencionado, supondría un gran ahorro económico en el sector. En todo el mundo, aproximadamente el 70% del ganado, y concretamente el 90% del ganado porcino se cría actualmente mediante IA (Rahman *et al.*, 2017). Algunos estudios respaldan que el descarte del 10% de los cerdos de una industria con peor calidad espermática, supondría un aumento de 2,23 individuos por parto (Roca *et al.*, 2015). El pequeño número de espermatozoides viables y fértiles necesarios para la inseminación artificial exitosa en otras especies como el ganado vacuno (20 millones de espermatozoides) en comparación con el número necesario para el proceso en cerdos (1–3 mil millones), subraya la importancia en el sector porcino de determinar de manera temprana la estabilidad del ADN para la selección de machos reproductores y realizar los procedimientos de inseminación sin fallos ni pérdidas económicas (Gosálvez *et al.*, 2011).

#### **4. LA CROMATINA ESPERMÁTICA**

De manera general, se consideran cinco niveles de organización de la cromatina. Cada uno de estos niveles puede conducir a expresiones activas del gen (cromatina activada) o expresiones inactivas (cromatina cerrada). El primer nivel es el estado de metilación del ADN, favoreciendo la hipermetilación la formación de heterocromatina. El segundo nivel está representado por el empaquetamiento de los nucleosomas, donde las disposiciones más densas indican heterocromatina. Las modificaciones histónicas en posiciones específicas son el tercer nivel y

establecen la activación de la cromatina, principalmente acetilada, o la inactivación de la cromatina, principalmente metilada. El grado de accesibilidad resultante para los factores de transcripción se considera como el cuarto nivel, y finalmente, la posición relativa de la cromatina, representa el quinto y último nivel (Carlberg y Molnár, 2016).

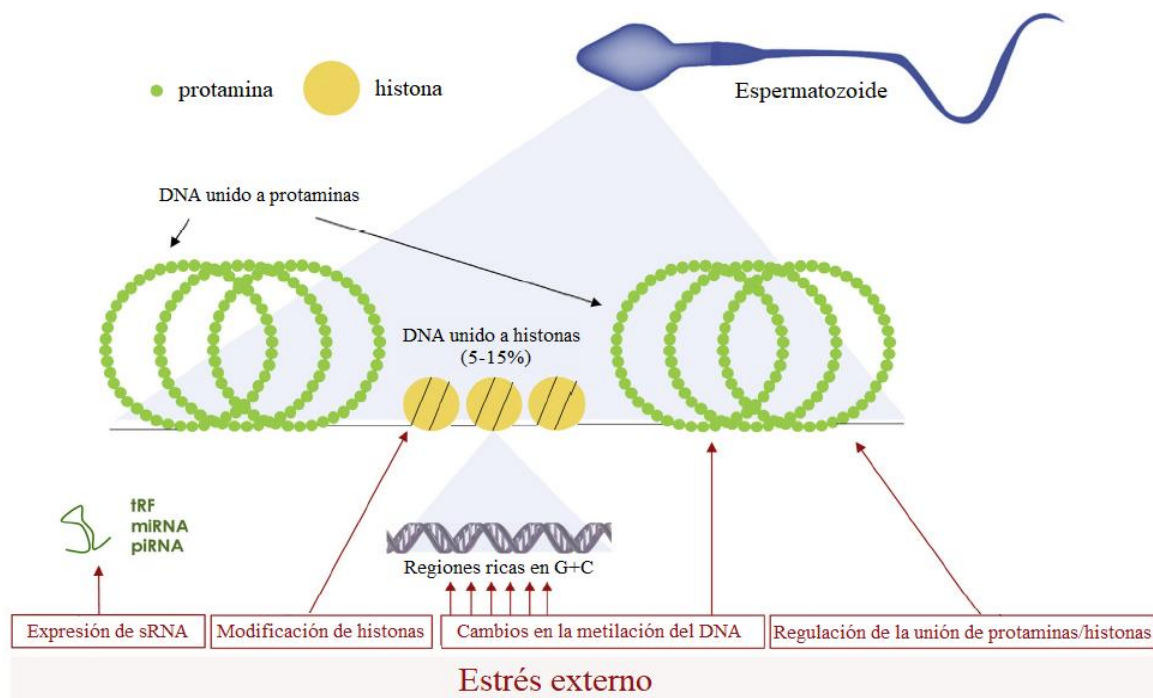
Una diferencia fundamental entre procariontes y eucariontes es la empaquetación del ADN. En el caso de eucariontes, el ADN aparece estrechamente asociado con una serie de proteínas denominadas histonas para formar un complejo que se denomina cromatina. Las histonas se encargan de limitar el acceso de enzimas y demás proteínas que leen y copian el ADN, pero sí permiten su adaptación al núcleo. (Pierce, 2014).

Los dos tipos básicos de cromatina son la eucromatina, que presenta procesos de descondensación y condensación normales durante el ciclo celular; y la heterocromatina, que en todo momento del ciclo celular presenta altos niveles de condensación. La primera constituye la mayor parte del material que contiene el cromosoma y es donde la transcripción es más activa. Sin embargo, todos los cromosomas van a tener regiones permanentes de heterocromatina constitutiva, especialmente en zonas cercanas al centrómero y los telómeros. Si, por el contrario, la heterocromatina aparece en ciertos momentos concretos del desarrollo, se denomina facultativa (Pierce, 2014).

En comparación con las células somáticas, los espermatozoides albergan una estructura y organización de cromatina muy distintas. Durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas en el núcleo espermático. Este intercambio no se hace de manera completa, aunque sí que serán las proteínas más abundantes en los espermatozoides (Pérez Peña, 2020). De esta manera, la unión del ADN en los espermatozoides a protaminas permite que la estructura de empaquetamiento del ADN sea seis veces más densa que cuando se une a histonas ya que tiene mayor capacidad de formar puentes disulfuro, ofreciendo una mayor protección del ADN frente a factores de estrés externos (Donkin y Barrès, 2018). El reemplazo de histonas por protaminas es un proceso gradual que tiene lugar durante la espermatogénesis y que conduce a la eliminación del 85-95% de las histonas, dependiendo de la especie (Barral *et al.*, 2017). Existen dos subtipos de protaminas: la de tipo I está formada por 47 aminoácidos y están presentes en todos los mamíferos, incluido el cerdo. Los humanos, ratones y caballos poseen a mayores la de tipo II (Pérez Peña, 2020). Las especies con ambos tipos de protaminas tienden a sufrir mayor descondensación de la cromatina y, por lo tanto, la exponen a más daños (Soria-Meneses *et al.*, 2019). En general, las protaminas de mamíferos tienen una región central

(aminoácidos 13-36) que consiste en un *cluster* de Argininas muy conservado y los extremos N y C-terminal son más variables entre especies. Otros factores influyentes en la calidad de la unión entre el ADN y las protaminas son la formación de puentes disulfuro y la cantidad de residuos de cisteína. Concretamente, las protaminas del cerdo contienen 10 residuos de este aminoácido frente a los 6 que contienen los humanos (Flores *et al.*, 2011).

Curiosamente, en la mayoría de las especies, la retención de histonas se produce predominantemente en regiones de alta densidad de CpG y baja metilación del ADN (Figura 1) (Barral *et al.*, 2017), por ejemplo, en los promotores de genes *housekeeping* y genes que controlan el desarrollo embrionario, por lo que sus modificaciones podrán afectar directamente a la calidad espermática del individuo (Hammoud *et al.*, 2011).



**Figura 1:** Descripción general de las marcas epigenéticas susceptibles de ser generadas con estrés externo. Se representa una estructura secundaria simplificada del genoma del esperma. Fuente: Adaptación de Donkin y Barrès (2018).

## 5. LA IMPORTANCIA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA Y SUS ALTERACIONES EN FERTILIDAD

Tradicionalmente, los espermatozoides se han considerado unas células muy especializadas con una sola función: conseguir la fecundación de un ovocito y aportar el componente paterno al genoma del embrión (Aitken *et al.*, 2016). No obstante, la disfunción de los espermatozoides por llevar a cabo esta tarea se ha relacionado en muchas ocasiones con la infertilidad masculina (Aitken *et al.*, 2006). Es bien conocido que la infertilidad es cada vez más frecuente, y es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad caracterizada

por la incapacidad de lograr un embarazo clínico tras doce o más meses de relaciones sexuales sin el uso de métodos anticonceptivos (World Health Organization, 2020).

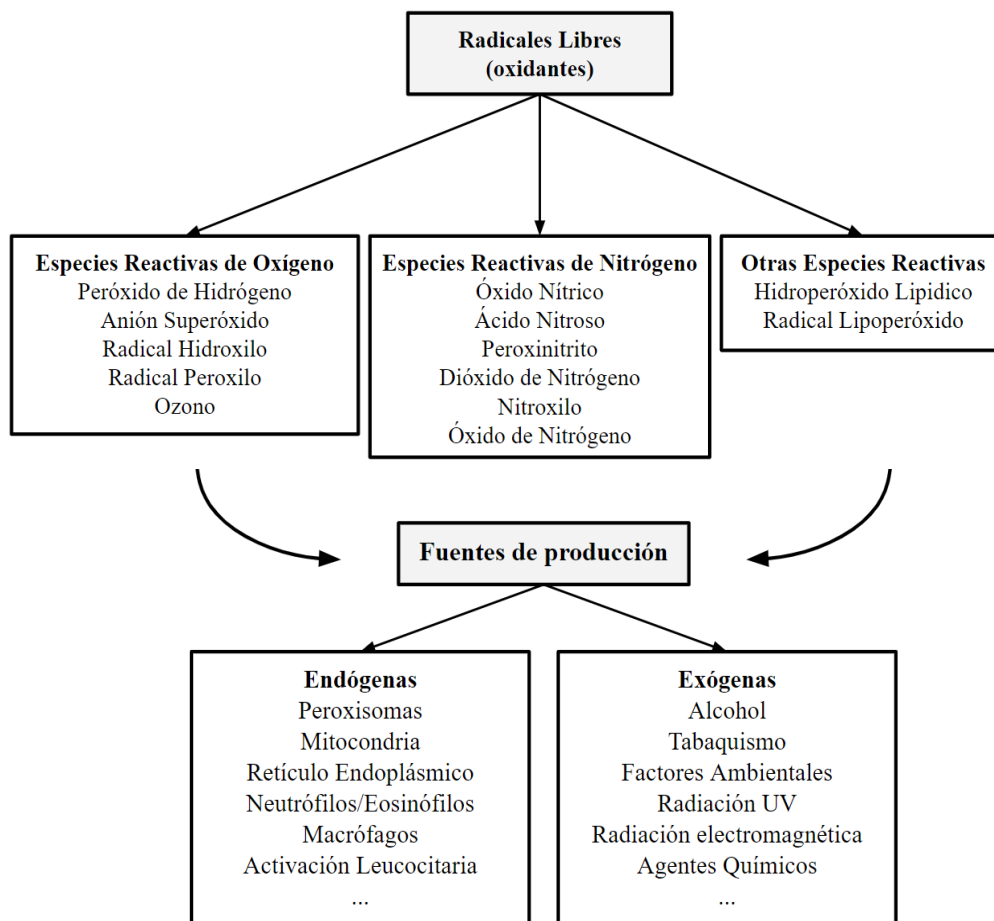
La infertilidad puede ser producida tanto por el componente femenino como por el masculino (Menkveld, 2010). El diagnóstico de la infertilidad masculina es una gran preocupación a nivel mundial tanto en humanos como en otros animales (Rahman *et al.*, 2017), y está relacionada con el 50% de los fracasos reproductivos asociados a los machos en la industria animal (Park *et al.*, 2013). Actualmente, la IA es la técnica de reproducción asistida menos dañina e invasiva, por lo que se utiliza a menudo con éxito para la cría de ganado en todo el mundo. Este enfoque está siendo cada vez más utilizado por la industria porcina para mejorar la genética de futuras generaciones y así maximizar la fertilidad y la producción (Dyck *et al.*, 2011).

Actualmente, gracias a diversos estudios, se conoce que la competencia funcional de un espermatozoide no se basa meramente en la capacidad de fecundar un ovocito, sino que también debe ser capaz de programar un patrón de señales que conlleven al desarrollo del embrión. Esto es, el espermatozoide puede afectar al desarrollo embrionario tanto por mecanismos genéticos como epigenéticos, tales como metilaciones en el ADN, modificaciones post-traduccionales (PTM) en las histonas, etc. (Aitken *et al.*, 2016). Es por ello que en los casos de infertilidad masculina se encuentran los siguientes posibles causantes:

#### 5.1. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas oxidativas muy reactivas, generalmente con radicales libres, que derivan del metabolismo del oxígeno (Agarwal *et al.*, 2006). Incluyen aniones superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical peroxilo ( $ROO^-$ ) y radical hidroxilo ( $OH^-$ ) mayoritariamente (Pérez Peña, 2020). Los radicales libres poseen un tamaño muy pequeño y un peso molecular menor que el de proteínas y moléculas de señalización, lo que permite que algunos puedan penetrar a través de las membranas celulares (Rahman, 2007).

Las fuentes de radicales libres pueden ser tanto endógenas como exógenas (Figura 2). La mayor producción endógena se genera como consecuencia del metabolismo celular durante la respiración aeróbica en las mitocondrias. Otras fuentes endógenas de radicales libres incluyen el peroxisoma, lipoxigenasas, neutrófilos, eosinófilos, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, etc. En cuanto a las fuentes exógenas, estas incluyen la radiación ionizante, luz ultravioleta, agentes quimioterapéuticos, factores ambientales como agentes infecciosos, alimentos, tabaquismo, alcohol, contaminación y, productos químicos, entre otros. (Thanan *et al.*, 2014).

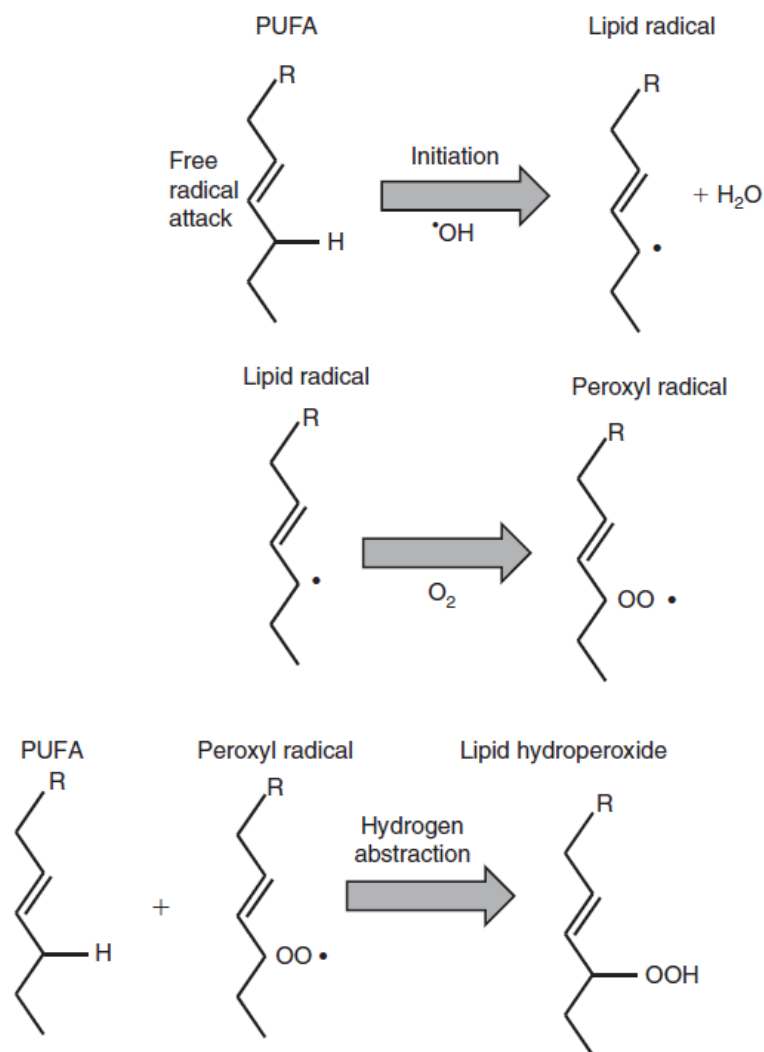


**Figura 2:** Tipos de radicales libres/oxidantes y sus fuentes de generación endógenas y exógenas. Fuente: Adaptación de Bisht y Dada (2017).

Las principales fuentes de ROS en el semen incluyen la activación de leucocitos en el plasma seminal y las mitocondrias de los espermatozoides. Existen grandes evidencias que sugieren que el daño mediado por ROS a los espermatozoides causa la infertilidad en 50-80% de individuos infértiles (Agarwal *et al.*, 2006).

Los niveles basales de ROS son necesarios para varios procesos fisiológicos sensibles a reacciones redox, como la capacitación espermática, reacción acrosomal, función esperma-ovocito y la hiperactivación de los espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides son altamente vulnerables al daño inducido por ROS, debido a la presencia de abundantes niveles de ácidos grasos polinsaturados (PUFA) en su membrana plasmática. Es por ello que niveles de ROS supra-fisiológicos deterioran la fluidez y permeabilidad de la membrana espermática. El mecanismo exacto de acción de los ROS para provocar esa deterioración es desconocido, pero se atribuye principalmente al daño peroxidativo en el axonema, al agotamiento de los niveles intracelulares de adenosín trifosfato (ATP) y a la peroxidación lipídica (Aitken *et al.*, 2012). En última instancia, este daño va a provocar fragmentación del ADN, interferencias en la reacción acrosomal y aumento de los procesos apoptóticos (Pérez Peña, 2020).

Cuando los ROS reaccionan con los PUFA, se producen una serie de metabolitos lipídicos entre los que se encuentran radicales peroxilo y varios aldehídos como 4-hidroxiacetaldehído (4-HNE) y malondialdehído (Moazamian *et al.*, 2015) debido a la oxidación de los componentes de la membrana lipídica (Aitken *et al.*, 2012). De esta manera, los radicales libres desestabilizan la membrana por su tendencia a atraer y extraer de los PUFA adyacentes sus correspondientes átomos de hidrógeno, provocando la formación de radicales de lípidos, que a su vez se combinan con oxígeno para generar más radicales peroxilo, que para estabilizarse a hidroperóxido necesitan extraer átomos de hidrógeno de los lípidos adyacentes, perpetuando así la cascada de peroxidación (Figura 3) (Aitken *et al.*, 2016).



**Figura 3:** Proceso ilustrativo de la cascada de peroxidación lipídica. Los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo porque contienen altas concentraciones de PUFA. Fuente: Aitken *et al.* (2016).

Los ROS no solo comprenden a los radicales de oxígeno, sino que incluyen una subclase de compuestos que contienen nitrógeno conocidos como especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estos también juegan un papel determinante en la capacitación de los espermatozoides. Uno de

los ejemplos más claros es el óxido nítrico (Doshi *et al.*, 2012). De manera análoga a los ROS, son necesarios para llevar a cabo ciertas funciones fisiológicas, pero en grandes concentraciones pueden provocar efectos patológicos en el sistema reproductor masculino (Pacher *et al.*, 2007). Concretamente, los RNS se han visto implicados en la inducción de la deficiencia funcional y la disminución de la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Yang *et al.*, 2005).

## 5.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una condición en la que el sistema de eliminación de radicales libres de la célula se ve abrumado por la sobreproducción de ROS (Valko *et al.*, 2007). En este estado, la relación de pro-oxidantes/anti-oxidantes muestra niveles desproporcionados a favor de los pro-oxidantes, que van a causar daño celular y tisular. Esto se debe a que los oxidantes activan vías de señalización específicas que conducen a un impacto negativo en los procesos celulares que finalmente desembocan en diferentes patologías (Bisht y Dada, 2017). Se conoce que el estrés oxidativo interfiere con la capacidad fecundadora de los espermatozoides. Asimismo, provoca daños en el ADN nuclear y afecta al perfil epigenético de estas células (Aitken *et al.*, 2014).

Las evidencias de que el daño oxidativo afecta a la función de los espermatozoides, se remontan a 1947, cuando un estudio observó que en zonas donde el agua marina estaba altamente irradiada con radiaciones ionizantes, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era mayor. Consecuentemente, los espermatozoides de los erizos de mar que habitaban estas zonas perdían considerablemente su capacidad fecundadora en comparación con los erizos que se encontraban en aguas no irradiadas (Evans, 1947). Hasta la actualidad, han sido muchos los estudios realizados en otras especies que respaldan esta teoría (Guthrie y Welch, 2012; Agarwal *et al.*, 2018).

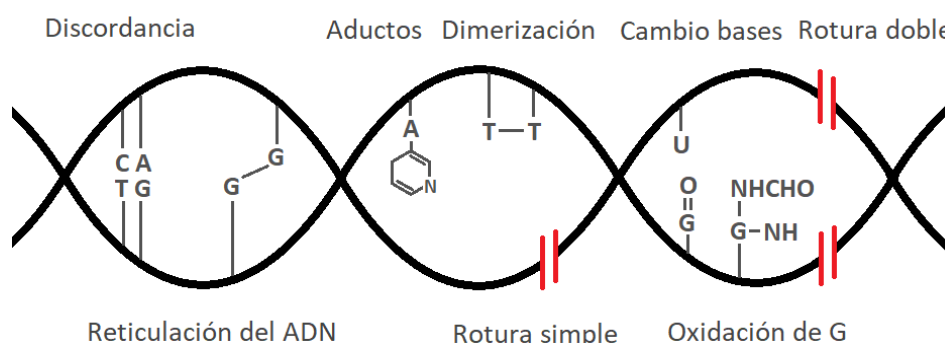
Una de las primeras funciones a las que afecta el estrés oxidativo es la motilidad de los espermatozoides (Aitken *et al.*, 2012). Además de los graves efectos que tiene la exposición a los ROS sobre la movilidad espermática, también hay evidencias de que el estrés oxidativo puede comprometer la capacidad de fecundación de los espermatozoides en situaciones en las que la motilidad es normal. Es por esto, que el uso de técnicas para la medición de parámetros convencionales como motilidad, concentración o vitalidad espermática no son suficientes para valorar la funcionalidad de los espermatozoides. En estas circunstancias, se sabe que el fallo recae en la incapacidad del espermatozoide de fusionarse con la membrana vitelina del ovocito (Aitken *et al.*, 2014).

### 5.3. Daño en el ADN

El daño oxidativo del ADN puede ser inducido por radicales de oxígeno, diversos agentes oxidantes, foto-oxidación y radiaciones ionizantes. Este daño puede resultar en la generación de sitiosapurínicos/apirimidínicos, roturas de cadena simple/doble, discordancia de bases, oxidación de guanina, etc (Figura 4). Las lesiones inducidas en el ADN pueden provocar ruptura cromosómica, inestabilidad genómica y ciertas patologías como el cáncer (Bisht y Dada, 2017).

Los daños en el ADN son el aspecto más importante a considerar en los casos de infertilidad. Independientemente a los mecanismos preventivos de las células, los ROS son uno de los factores intrínsecos más importantes que influyen en la fragmentación del ADN (Saleh *et al.*, 2002). Estos afectan a la organización de la cromatina espermática dejando al ADN vulnerable a otros daños (Aoki *et al.*, 2005). Existen también factores extrínsecos que pueden producir fragmentación en el ADN tales como la edad, la temperatura testicular o la exposición a ciertos compuestos químicos (González-Marín *et al.*, 2012).

La oxidación de guanina generando 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es el aducto oxidativo de ADN más común y sirve como el mejor indicador de daño en el ADN mediado por estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Principales causas de daño producido en el ADN. Fuente: Adaptación de González-Marín *et al.* (2012).

Por su parte, los espermatozoides presentan dos características en la cromatina que los diferencian de las células somáticas. La primera de ellas es la ya mencionada protaminación, que permite una mayor compactación de la cromatina del espermatozoide, y la segunda es que carecen de mecanismos de reparación del ADN, por lo que son más vulnerables al estrés oxidativo. Cabe mencionar que los mecanismos de reparación del espermatozoide se encuentran activos durante la espermatogénesis, pero en etapas post-espermatogénicas se detienen. No obstante, el ovocito es capaz de reparar algunos de estos daños que se producen en etapas tardías (González-Marín *et al.*, 2012).



#### 5.4. Reducción del daño oxidativo

Se requiere que el estado reducido y oxidado de la célula se mantenga en equilibrio para impulsar funciones celulares esenciales de proliferación celular, regulación del ciclo celular, señalización celular, apoptosis, etc. Pese a que los espermatozoides carecen de mecanismos de reparación, las células emplean un sistema antioxidante natural que incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para regular el impacto negativo de ROS. Los antioxidantes funcionan reduciendo los niveles de ROS y, por lo tanto, anulan el impacto del estrés oxidativo en la célula previniendo el daño en el ADN, proteínas y lípidos. Los antioxidantes enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, etc. y los antioxidantes no enzimáticos la vitamina E y C, carotenoides, ácidos grasos omega 3 y 6, glutatión reducido, coenzima Q10 y L-arginina, entre otros. También se pueden clasificar como antioxidantes endógenos y exógenos o dietéticos. Otro factor que aumenta la vulnerabilidad de los espermatozoides es que contienen bajas concentraciones de compuestos orgánicos halogenados (AOX), y en el plasma seminal los AOX se agotan rápidamente (Bisht y Dada, 2017).

### **6. LAS HISTONAS EN EL ADN ESPERMÁTICO Y SUS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS**

El ADN en los espermatozoides puede encontrarse unido a histonas o protaminas. Las histonas son las proteínas más abundantes de la cromatina. Éstas son pequeñas proteínas cargadas positivamente que se dividen en cinco clases: H1, H2A, H2B, H3 y H4. En cuanto a su composición, se caracterizan por tener alto contenido de arginina y lisina. Estas cargas positivas les van a permitir la atracción de los grupos fosfato del ADN, cargado negativamente, estableciendo una unión consistente con el mismo. En los cromosomas de eucariontes, generalmente hay variedades de proteínas cromosómicas no histónicas que se incorporan a la cromatina uniéndose en los conectores entre nucleosomas (Pierce, 2014).

Las histonas centrales H2A, H2B, H3 y H4 empaquetan el ADN en nucleosomas y modifican la estructura de la cromatina (Tang *et al.*, 2015). El nucleosoma consiste en una partícula central compuesta de ADN que se envuelve dos veces alrededor de pares de histonas H2A, H2B, H3 y H4. Cada una de estas histonas presentes en el nucleosoma contiene una extensión a modo de “cola” flexible compuesta por unos 11-37 aminoácidos cargados positivamente que favorecen la interacción con el ADN. Estas extensiones también permiten la interacción con otros nucleosomas colindantes, favoreciendo la condensación del ADN. Por su parte, la histona H1,

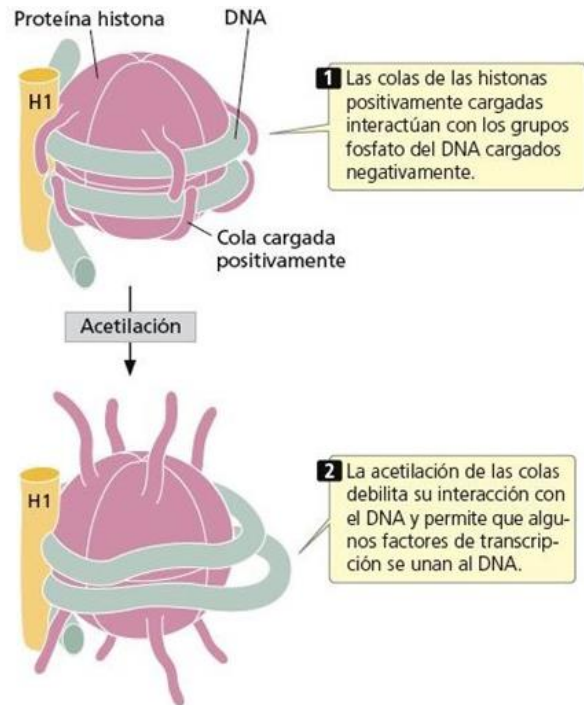
no forma parte de este complejo, pero también se une a 20-22 pares de bases del ADN bloqueándolo alrededor del octámero de histonas (Pierce, 2014).

Las modificaciones epigenéticas en las colas de las histonas son necesarias para facilitar la expresión génica. Conrad Waddington fue el primero que, en 1942, empleó el término “epigenética” para referirse a cómo, durante el proceso de desarrollo, un genotipo producía un fenotipo. Los cambios epigenéticos consisten en modificaciones de la estructura del material genético o de la cromatina. Aunque no afectan a la secuencia de ADN, influyen fuertemente la expresión de genes. Se han detectado más de cien modificaciones diferentes en histonas la mayoría relacionadas con la adición de grupos fosfato, metilo, acetilo y ubiquitina. En ocasiones, estas modificaciones van a servir como unión de factores de transcripción, favoreciendo la misma (Pierce, 2014).

La modificación más frecuente en histonas es la adición de grupos metilo en las colas de histonas. Dependiendo de los aminoácidos que se vean modificados, estas metilaciones tendrán como consecuencia la activación o represión de genes. Existen una serie de enzimas conocidas como histona-metiltransferasas (DNMT) que añaden grupos metilo a las histonas, mientras otro grupo de enzimas conocidas como desmetilasas los retiran (Carlberg y Molnár, 2016).

Una de las modificaciones más comunes en mamíferos, entre los que se incluye el ganado porcino, es la adición de tres grupos metilos en alguno de los residuos de lisina de la H3 (Pierce, 2014). La H3 en mamíferos está representada por tres isoformas casi idénticas de 135 aminoácidos denominadas H3.1, H3.2 y H3.3 (Tang *et al.*, 2015). Generalmente, las metilaciones están relacionadas con una represión de la expresión, aunque el resultado de la modificación depende del residuo de lisina en el que se produzca; por ejemplo, la adición de tres grupos metilo en las lisinas 4 y 36 de H3 se asocia a mayor transcripción, mientras que en la lisina 9 produce el resultado opuesto (Carlberg y Molnár, 2016). En el caso de otras histonas, como la H2A, no se produce metilación en ningún aminoácido. Además, existen unas proteínas pertenecientes al grupo *polycomb* que reprimen la transcripción al hacer la cromatina inaccesible. Por ejemplo, el complejo polycomb-2 agrega dos o tres grupos metilo en la lisina 27 de la H3 que reprimen la transcripción. De este caso hablaremos más adelante ya que en diversos estudios se ha demostrado que esta marca epigenética está estrechamente relacionada con una disminución de la calidad espermática (Kutchy *et al.*, 2018; Štiavnická *et al.*, 2019).

Otro tipo de PTM que se producen en las histonas es la acetilación (Figura 5). Consiste en la adición de grupos acetilo en las histonas por medio de enzimas acetiltransferasas. Otras enzimas denominadas desacetilasas se encargan de retirar estos grupos acetilo de las histonas, reestableciendo la estructura de la cromatina. Por lo general, estas modificaciones favorecen la transcripción de genes. Esto se debe a que estos grupos acetilo tienden a desestabilizar la estructura de la cromatina, lo que determina que está presente una estructura abierta a la maquinaria de transcripción (Pierce, 2014).



**Figura 5:** La acetilación modifica la estructura de la cromatina permitiendo la unión de factores de transcripción al DNA. Fuente: Pierce (2014).

Muchos de los cambios epigenéticos mencionados son estables y persistentes a lo largo de la vida del individuo e incluso se transmiten a las siguientes generaciones. Sin embargo, el proceso de mantenimiento de las modificaciones en histonas no está tan bien estudiado como el de la metilación del ADN. En cualquier caso, las únicas reglas generales que pueden establecerse es que la acetilación de histonas siempre favorece la transcripción y la metilación del ADN siempre favorece la represión. Sin embargo, en cuanto a la metilación de las histonas no se puede establecer ninguna regla general (Carlberg y Molnár, 2016).

## 7. MÉTODOS TRADICIONALES PARA EL ESTUDIO DEL ADN ESPERMÁTICO

El análisis tradicional del ADN espermático consiste en el estudio de parámetros de calidad general tales como la concentración, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. Durante muchos años se buscaba causalidad de la infertilidad masculina en la deficiencia en alguno de estos parámetros. Sin embargo, ha habido numerosos casos en los que todos estos parámetros se encontraban dentro del rango "normal", pero el factor masculino persistía en el fallo de la inseminación (Evenson, 2016).

### 7.1. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

En los años 80 se produjo un gran avance en la tecnología que rodeaba a la biología molecular. Evenson *et al.* (1980) desarrollaron un ensayo de citometría de flujo para la detección de la fragmentación de ADN en espermatozoides. Denominaron a esta técnica como SCSA.

El ensayo se basa en la detección de fragmentación de ADN por citometría de flujo. El ADN de los espermatozoides se desnaturaliza con un detergente ácido en los sitios de ruptura de la cadena de ADN y posteriormente se tiñe con naranja de acridina (AO), un colorante catiónico fluorescente y metacromático. En este ensayo, el AO se une al ADN en la proporción de aproximadamente dos moléculas de AO por grupo fosfato. Cuando el láser del citómetro de flujo incide en las células, el AO fluoresce con una emisión verde cuando se encuentra unido al ADN bicatenario y con una emisión roja cuando se une al ADN monocatenario (Chohan *et al.*, 2006). Por lo general, esta técnica permite analizar un total de 5000-10000 células por muestra en pocos minutos. El índice de fragmentación del ADN (DFI) se describe como la relación de fluorescencia roja entre fluorescencia total. (Shamsi *et al.*, 2011).

En humanos, los porcentajes de ADN fragmentado (%DFI) superiores a 30% se consideran por encima del umbral para el pronóstico de baja fertilidad mediante SCSA (Evenson *et al.*, 2002). Las observaciones son similares para toros y verracos donde las anomalías de la cromatina superiores al 25% también se relacionan con baja fertilidad (Bochenek *et al.*, 2001).

### 7.2. TUNEL

Entre los diferentes tipos de ensayos disponibles para determinar daño de ADN, el TUNEL es uno de los ensayos más antiguos. Fue desarrollado por Ausubel *et al.* (1992) y se aplicó por primera vez a espermatozoides por Gorczyca *et al.* (1993). El ensayo se basa en la unión de dUTP a los extremos fosfato 3'-OH presente en fragmentos de ADN con roturas de cadena sencilla y doble. El dUTP incorporado puede cuantificarse mediante citometría de flujo, microscopía fluorescente o microscopía óptica. A diferencia del SCSA, detecta daño en el ADN inducido por condiciones ácidas. Los ensayos TUNEL y SCSA se correlacionan bien, aunque determinan diferentes aspectos de la función espermática (Mitchell *et al.*, 2011).

Generalmente, el ensayo TUNEL se cuantifica mediante citometría de flujo o microscópicamente con marcajes de fluorescencia o colorimetría. Este último, debe realizarse preferiblemente en casos con muy bajo recuento de espermatozoides.

### 7.3. COMET

El campo de la electroforesis se desarrolló en los años ochenta y se optimizó durante los noventa, lo que permitió detectar la fragmentación del ADN mediante el ensayo COMET (Rex *et al.*, 2017). El COMET es un ensayo electroforético de gel de una sola célula que cuantifica hebras rotas de ADN. Dentro de un gel de agarosa, las membranas de los espermatozoides se lisan. Si el ADN presenta roturas, se libera del superenrollamiento permitiendo que el ADN migre hacia el ánodo. Esta migración deja una cola similar a la de un cometa, de ahí el nombre del ensayo (Lewis *et al.*, 2013).

El ensayo COMET es muy sensible y capaz de detectar grados de daño en el ADN de manera individualizada en lugar de un porcentaje de espermatozoides dañados en una muestra completa. Además, mide tanto roturas como alteración de bases. Esto resulta útil, ya que aún no se conoce qué tipos de daños en el ADN son más perjudiciales para la fertilidad masculina. Otra ventaja es que, a diferencia de otras pruebas que detectan principalmente roturas en cromatina asociada a histonas, el ensayo COMET tiene un uso más amplio en la detección de roturas tanto en cromatina asociada a protaminas como a histonas (Simon *et al.*, 2011).

Existen dos tipos de ensayo COMET. Por un lado, se encuentra el ensayo en condiciones alcalinas, en las que el ADN se desnaturaliza. Esta desnaturalización permite la identificación de roturas de cadena simple y doble. Sin embargo, la presencia de pH alcalino disminuye la sensibilidad de este test, llegando en ocasiones a no ser lo suficientemente preciso. Por otro lado, se encuentra el ensayo en condiciones neutras, en las que el ADN no se desnaturaliza y por tanto es más sensible y preciso, aunque solo es capaz de identificar roturas de doble cadena (Evenson *et al.*, 2002). El ensayo COMET puede cuantificar el daño del 0 al 100% para cada espermatozoide (Simon *et al.*, 2011).

### 7.4. Sperm Chromatin Dispersion test (SCD)

La SCD o prueba de Halo se comercializa en un kit simple y económico disponible para laboratorios de fertilidad. La técnica implica una descondensación diferencial de la cromatina. Después de esta descondensación, los espermatozoides que presenten fragmentación de ADN son visualmente más pequeños que aquellos con ADN intacto, que mostrarán un "halo" alrededor de la cabeza del espermatozoide. Se necesita aproximadamente una hora para preparar los portaobjetos antes de contar individualmente células con microscopía de campo claro. A diferencia de las otras pruebas, mide la ausencia de daños en lugar del ADN dañado (Lewis *et al.*, 2013).

A continuación, se presenta en la Tabla 1, un resumen de las características principales de cada una de las técnicas descritas anteriormente:

MÉTODO	FUNDAMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
SCSA	Análisis y tinción con naranja de acridina mediante citometría	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estadísticamente aceptable</li> <li>- Predice la infertilidad</li> <li>- Detecta descondensación de la cromatina</li> <li>- Baja variabilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La citometría es cara</li> <li>- La tinción manual tiene una gran variabilidad y puede dar lugar a errores</li> </ul>
TUNEL	Etiquetado dUTP de roturas de filamentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reproducible por citometría de flujo</li> <li>- Detecta roturas de cadena simple y doble</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La citometría es cara</li> </ul>
COMET	Técnica electroforética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muy sensible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se requieren condiciones separadas para la detección de roturas de doble y única cadena</li> <li>- Difícil de optimizar y estandarizar</li> </ul>
SCD	Tinción de 'bucles' de ADN en agarosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple y económico</li> <li>- Permite el análisis de poblaciones espermáticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se analizan pocos espermatozoides</li> <li>- Pueden sufrir variabilidad técnica</li> </ul>

**Tabla 1:** Métodos para la detección de daños en el ADN en espermatozoides. SCD = *sperm chromatin dispersion test*; SCSA = *sperm chromatin structure assay*; TUNEL = TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*)-mediated *dUDP nick-end labelling*. DNA fragmentation. Fuente: traducción de la tabla realizada por Wright *et al.* (2014).

## 8. MÉTODOS NOVEDOSOS PARA EL ESTUDIO DEL ADN ESPERMÁTICO

En los últimos años, los ensayos COMET, SCSA, SCD y TUNEL han sido estudiados ampliamente para analizar la integridad de la cromatina espermática. No obstante, han sido muy criticados ya que los resultados de estas pruebas no mostraban resultados equivalentes (Lewis *et al.*, 2013). La imprecisión de las técnicas, sumado a la alta compactación del ADN espermático en cerdos, hace que estas técnicas convencionales rara vez detecten daños en el ADN de manera fiable. Actualmente, se están estudiando pruebas más complejas de detección de daño en el ADN y de la cromatina espermática con la esperanza de que puedan proporcionar un diagnóstico más preciso que los parámetros espermáticos estándar que se mencionaban anteriormente (Zini *et al.*, 2014).

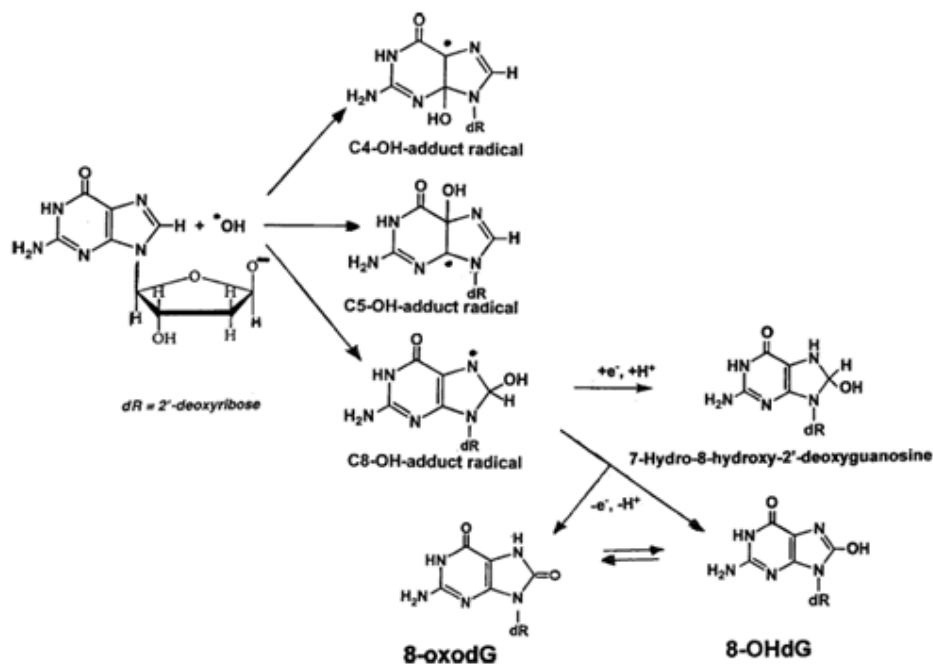
El objetivo de estas técnicas es la optimización de anticuerpos para identificar de manera temprana el daño oxidativo en el ADN, así como ciertas modificaciones epigenéticas en

histonas que se correlacionan con ADN espermático de baja calidad. En definitiva, usar biomarcadores que indiquen alteraciones en la cromatina que afecten la fertilidad.

### 8.1. Detección de 8-OHdG

Como se mencionó previamente, la infertilidad se produce debido al estrés oxidativo y causa daño en el ADN. El marcador que ejerce como mejor indicador de este daño es la formación de aductos de 8-OHdG, particularmente en zonas no protaminadas del genoma (Aitken *et al.*, 2016). Por lo tanto, el diagnóstico temprano de este biomarcador va a ayudar a la identificación de aquellos individuos subfértiles e infértiles de manera más temprana y más fiable que las técnicas descritas con anterioridad (Valavanidis *et al.*, 2009).

La guanina es un compuesto aromático heterocíclico cuya construcción se basa en una pirimidina fusionada a un anillo de imidazol. Es un componente básico del ADN y el ARN, formando en el primero pares complementarios con la citosina. Tanto en estado libre como en nucleósido, es particularmente susceptible a los efectos de radicales libres en la posición del carbono número 8 (Dabrowska y Wiczowski, 2017). La interacción de los ROS con las bases de guanina del ADN conlleva a la formación de C8-hydroxyguanina (8-OHGua) o su forma de nucleósido, 8-OHdG. Inicialmente, la reacción de la adición de ROS conduce a la generación de aductos y luego, mediante la abstracción de un electrón, se forma la 8-OHdG. La 8-OHdG sufre tautomerismo cetoenólico, que favorece el producto oxidado 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) (Vorilhon *et al.*, 2018).



**Figura 6:** La reacción de la 2-deoxiguanosina con un radical hidroxilo conduce a la formación de aductos de Guanina, reducción a 7-hidro-8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y posterior oxidación a 8-OHdG, o su tautómero 8-oxodG. Fuente: Valavanidis *et al.* (2009).

Aunque los ROS afectan a muchas otras bases del ADN de manera similar, la formación de 8-OHdG es el daño más abundante en el ADN ya que se forma de manera relativamente sencilla. Esta marca oxidativa es interesante porque puede ser medida cuantitativamente mediante métodos inmunoquímicos usando anticuerpos frente a la 8-OHdG (Valavanidis *et al.*, 2009).

Los espermatozoides poseen una única enzima en la vía de reparación de escisión de bases (BER), la glucosilasa OGG1, y carecen de los componentes *downstream* de la vía BER, entre ellos, la endonucleasa APE1. La glicosilasa OGG1 puede escindir activamente los aductos 8-OHdG, liberándolos al espacio extracelular. Esta escisión crea sitios abásicos en el ADN, que no se reparan hasta el proceso de fecundación, lo que desestabilizará el ADN, provocando la apertura del anillo de ribosa y posterior ruptura de la cadena (Aitken *et al.*, 2016). Ciertas técnicas convencionales como TUNEL son incapaces de detectar los sitios abásicos, debido a que la carencia de la enzima APE1 no permite la creación de grupos hidroxilo en el extremo 3'; sin embargo, serían fácil y rápidamente detectables mediante técnicas inmunoquímicas (Aitken *et al.*, 2013).

Existen diversos estudios que han probado estos ensayos inmunoquímicos con éxito en otras especies diferentes a cerdos. Uno de los primeros estudios llevados a cabo fue el de De Iuliis *et al.* (2009), en el que comprobaron en humanos la hipótesis de que el daño oxidativo en las bases y la fragmentación del ADN estaban correlacionados con una alteración en el proceso de protaminación. Para ello, estudiaron la fragmentación del ADN, la protaminación de la cromatina, el potencial de la membrana mitocondrial y la formación del aductos de 8-OHdG con citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. Concluyeron que:

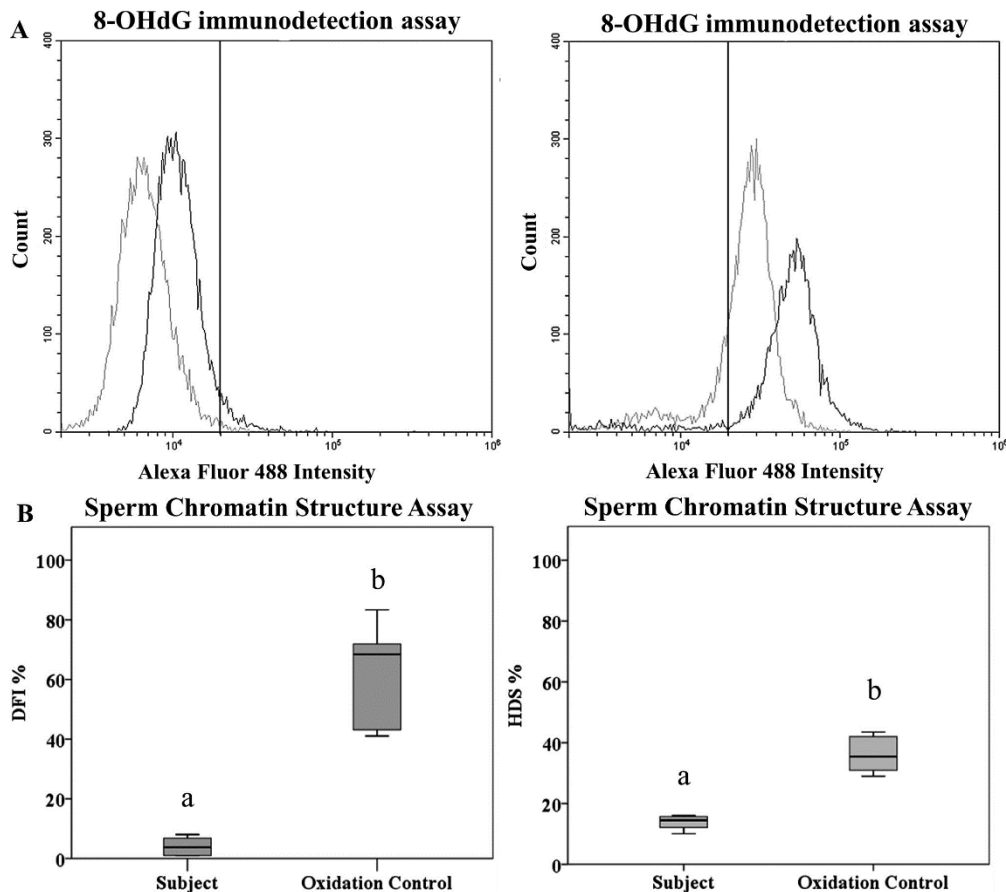
- El fallo en los procesos de protaminación del ADN durante la espermatogénesis tardía estaba altamente correlacionado con el daño del ADN en los espermatozoides humanos.
- La interrupción de la remodelación de la cromatina estaba asociada con altas concentraciones en de 8-OHdG, y este último también se relacionaba con la fragmentación del ADN.

La importancia del estrés oxidativo en la formación de aductos de 8-OHdG fue demostrada por exposición de las muestras a  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$ . Estos resultados resaltaron la importancia del papel que juega el estrés oxidativo en la inducción de daño en el ADN espermático y las implicaciones que éste tiene clínicamente.

Un estudio más reciente y similar con la especie porcina, es el experimento que llevaron a cabo Soria-Meneses *et al.* (2019) en ovino, basándose en los protocolos que habían establecido De



Iuliis *et al.* (2009) y Vorilhon *et al.* (2018) para esta misma cuantificación en humanos. En este experimento se realizó una inmuno-detección indirecta con dos tiempos de incubación diferentes. Las muestras se incubaron con Anticuerpo Monoclonal anti-8-OHdG de ratón (mouse anti-8-OHdG monoclonal antibody DNA/RNA damage antibody-15A3, NB110-96878, Novus Biological®) y después con Anticuerpo secundario Alexa Fluor™488 de cabra anti-ratón (Fisher Scientific). Para cada tiempo de incubación, realizaron un control negativo sin tratamiento con anticuerpo primario, un control tratado únicamente con anticuerpo secundario para verificar enlaces no específicos y un control positivo totalmente oxidado. Comprobaron tanto la fragmentación por SCSA, como los índices de fluorescencia de cada muestra. Así, pudieron establecer si existía correlación entre fragmentación y formación de 8-OHdG, cuál de los métodos aportaba mayor fiabilidad y si había diferencias entre los tiempos de incubación.



**Figura 7:** (A) Ensayo de inmunodetección de 8-OHdG en el control positivo (izq) y en las muestras (dcha). La línea gris se corresponde a la incubación durante 30 minutos y la negra durante toda la noche. (B) Ensayo de fragmentación del ADN por SCSA. Se muestra %DFI (izq) y %HDS (dcha). (a) y (b) en los ensayos SCSA indican muestras y control respectivamente, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Fuente: Soria-Meneses *et al.* (2019).

Concluyeron, en primer lugar, que no había diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación con el anticuerpo primario probados. Sin embargo, la incubación durante la noche parece causar más uniones no específicas del anticuerpo secundario por lo que se consideró menos precisa. En segundo lugar, para los niveles de oxidación a los que se

sometieron las muestras espermáticas, tanto la determinación de SCSA como la de 8-OHdG muestran resultados similares (Figura 7).

Esto sugiere que ambos ensayos se correlacionan, pero la inmunodetección de 8-OHdG es más fiable ya que hay situaciones en que el nivel de oxidación es suficiente para causar daño significativo en el ADN que no resulta en fragmentación de la cadena; por lo tanto, estos casos se detectarían por inmunodetección de 8-OHdG pero no por SCSA (Soria-Meneses *et al.*, 2019).

El hecho de que el ensayo de inmunodetección de 8-OHdG sea específico para detectar daños en el ADN causado por estrés oxidativo lo hace muy interesante. Hasta ahora, esta técnica se ha llevado a cabo en muy pocas especies como ratones (Gharagozloo *et al.*, 2016), caballos (Serafini *et al.*, 2018) y humanos (Vorilhon *et al.*, 2018), entre otros, lo que establece altas expectativas para su aplicación en cerdos.

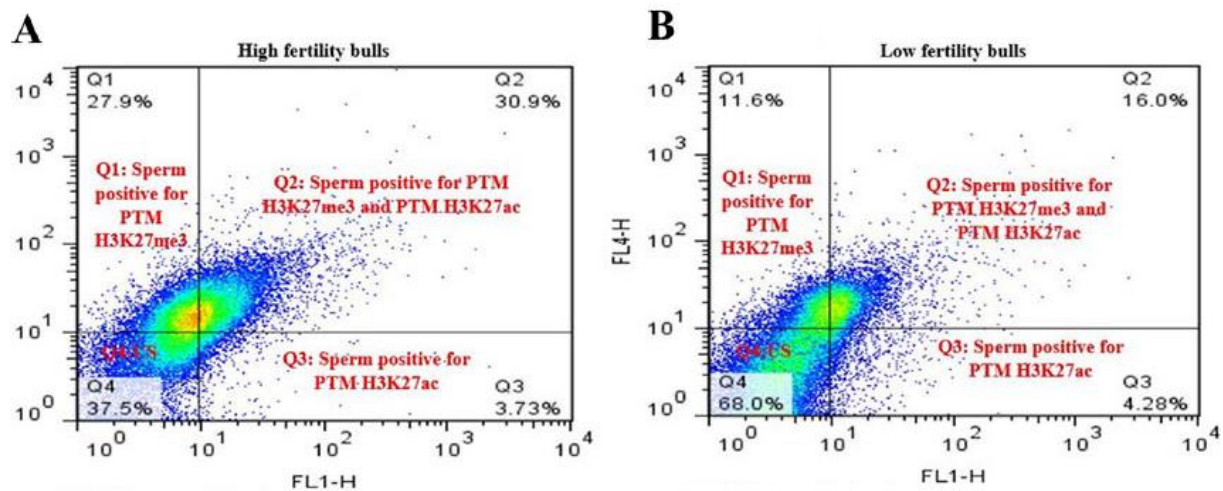
## 8.2. Detección de modificaciones epigenéticas: metilación y acetilación de histonas

El estrés oxidativo puede ser uno de los responsables de las alteraciones epigenéticas en histonas. Las modificaciones de histonas y remodelación de la cromatina son fácilmente inducibles y tienen como resultado la alteración de procesos biológicos y, por lo tanto, tienen un papel importante en varios trastornos, incluida la infertilidad masculina (Bisht y Dada, 2017). Además de la apoptosis y el estrés oxidativo, el empaquetamiento inadecuado de la cromatina en espermatozoides es uno de los factores de daño del ADN espermático que contribuyen a la infertilidad masculina (Dogan *et al.*, 2015). Los espermatozoides se generan a partir de células germinales primordiales a través de distintos procesos. En consecuencia, sus genomas se empaquetan de manera diferente con distintos resultados epigenéticos (Burton y Torres-Padilla, 2014).

Las modificaciones epigenéticas en las histonas son cruciales para la fisiología adecuada de los espermatozoides, la activación del óvulo y el desarrollo reproductivo de los machos. En su estudio, Kutchy *et al.* (2018) determinaron la conservación de la H3 y su dinámica de expresión en estado de acetilación y metilación (H3K27ac y H3K27me3) en espermatozoides de toros Holstein. Se utilizaron métodos en inmunoquímicos y citometría de flujo para evaluar la expresión de H3K27ac y H3K27me3 en espermatozoides de 10 toros con diferentes grados de fertilidad: 5 toros con baja fertilidad (LF) y 5 con alta fertilidad (HF). Esta clasificación se estableció gracias a estudios previos de Peddinti *et al.* (2008). Los espermatozoides de cada uno de los individuos fueron incubados con anticuerpo primario monoclonal anti-H3K27me3 de

ratón (Abcam, Cambridge, MA, USA; catalog #6002; 1/200 dilution) y anti-H3K27ac de conejo (Abcam; catalog #4729; 1/200 dilution). Después se añadieron los anticuerpos secundarios: anticuerpo anti-IgG de ratón procedente de burro en el caso de H3K27me3 (Abcam; catalog #96876; 1/5,000 dilution) y anticuerpo anti-IgG de conejo procedente de burro en el caso de H3K27ac (Santa Cruz, Dallas, TX, USA; catalog # 2090; 1/5,000 dilution).

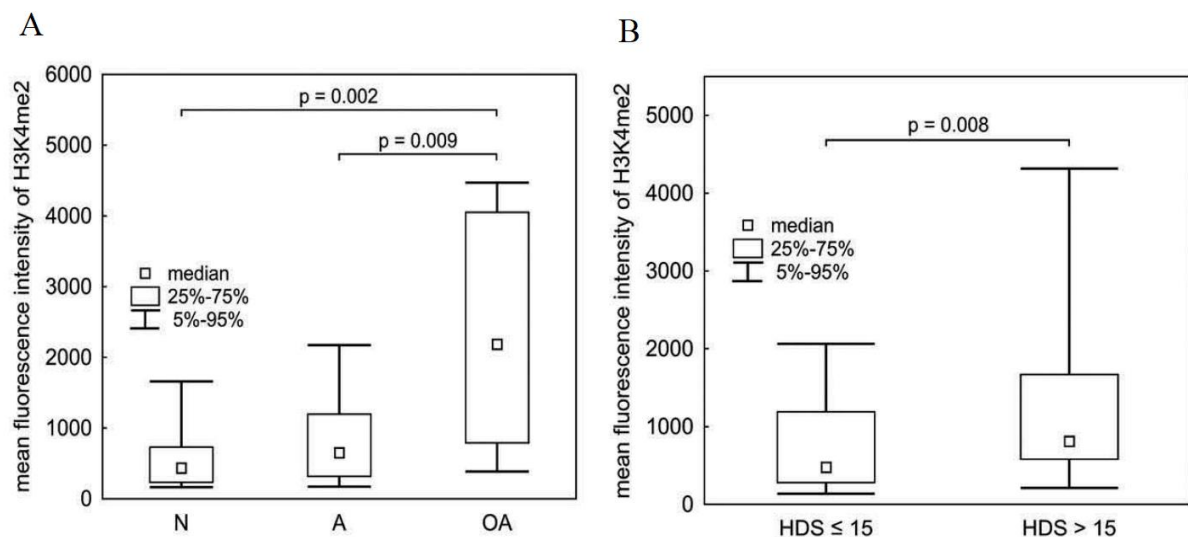
Por un lado, los resultados de la localización celular de las modificaciones histónicas indicaron que tanto H3K27ac como H3K27me3 se mostraron principalmente en la cabeza del espermatozoide, detectando una fuerte presencia de H3K27me3 en forma de corona alrededor de la cabeza del espermatozoide. Por otro lado, se evaluó la expresión de ambas modificaciones mediante citometría. Estas mostraron diferentes perfiles de histograma entre toros HF y LF. Durante la espermatogénesis, se produce el remplazo de histonas por protaminas, lo que favorece la condensación del ADN, teniendo los individuos HF mayor número de protaminas (Dogan *et al.*, 2015). En este caso, se observó que menores niveles de histonas implican una mayor sustitución de histonas por protaminas, de manera que en los individuos HF cabe esperar mayor cantidad de protaminas (Figura 8). Un ADN con mayor número de protaminas y por consiguiente más condensado está menos expuesto a daños exógenos y endógenos, por lo que una baja protaminación se relaciona con la infertilidad. En cuanto a las PTM, los niveles de metilación en ambos grupos fueron significativamente más altos que los de acetilación. Por lo tanto, la compactación de la cromatina, la retención de PTM de histonas y la incorporación de protaminas determinan el estado de salud molecular y celular de los espermatozoides. Por el contrario, la retención anormal de histonas es un claro indicador de espermatozoides inmaduros (De Oliveira *et al.*, 2013).



**Figura 8:** Porcentaje de: (A) Espermatozoides en toros HF que expresan H3K27ac, H3K27me3, doble positivo (DP) y sin teñir (US). (B) Espermatozoides en toros LF que expresan H3K27ac, H3K27me3, DP y US. Q1: Expresión de H3K27me3. Q2: Expresión de H3K27ac y H3K27me3. Q3: Expresión de H3K27ac. Q4: Sin expresión de H3K27ac ni H3K27me3 (no están teñidos). Fuente: Kutchy *et al.* (2018).

Este estudio es el primero que evalúa modificaciones histónicas en espermatozoides de toro y lo correlaciona con los niveles de fertilidad. Hasta la fecha, se ha realizado en pocas especies. Ambas PTM permiten comprender las diferencias entre baja y alta fertilidad en toros, lo que promete ser extrapolable a otras especies de mamíferos, debido a la alta conservación de la histona H3 (Kutchy *et al.*, 2018).

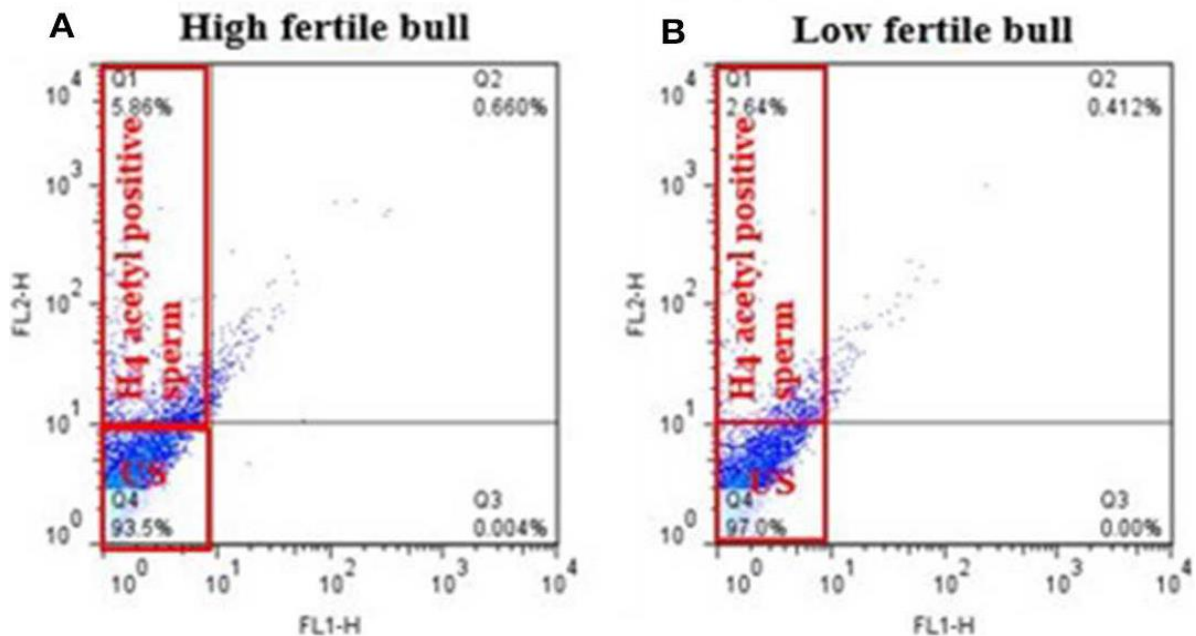
De manera análoga se han estudiado otros marcadores genéticos potencialmente relacionados con el estudio de la fertilidad clínica. Štiavnická *et al.* (2019) estudiaron la dimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me2) en humanos, también relacionada con la protaminación, como marcador de la calidad espermática con potencial uso en medicina reproductiva. Para ello, compararon los parámetros de dimetilación, fragmentación e inmadurez del ADN mediante citometría de flujo. Al combinar tres métodos diferentes de evaluación, el estudio establece el marcador molecular H3K4me2 como un indicador de intercambio aberrante de histonas a protaminas, lo que resulta en una mala condensación de cromatina. Esto se refleja en una mayor inmadurez y por consiguiente peor calidad del ADN por su mayor exposición a daños tanto internos como externos. Las muestras con mayor índice de inmadurez de la cromatina (HDS) y por consiguiente, menor protaminación y mayor daño espermático, presentaron mayor intensidad de fluorescencia de H3K4me2 (Figura 9).



**Figura 9:** Relación entre el marcaje de H3K4me2 y la calidad y madurez de la cromatina. A) Comparación de la intensidad de fluorescencia H3K4me2 entre muestras normozoospermicas (N), astenozoospermicas (A) y oligozoospermicas (OA); B) y entre muestras con HDS ≤ 15 y HDS > 15. Fuente: Štiavnická *et al.* (2019).

Por otro lado, Ugur *et al.* (2019) demostraron la hipótesis de que la histona H4 y sus PTM están asociadas con la dinámica de la cromatina y fertilidad en toros. En este caso, la acetilación de H4 está relacionada con la correcta remodelación de la cromatina durante la espermatogénesis (Kleiman *et al.*, 2008). En cuanto a la localización y detección de la acetilación de la histona

H4, estaba distribuida de manera uniforme en la cabeza de los espermatozoides tanto de los toros LF como de los HF. El estudio de citometría de flujo mostró que los niveles reducidos de H4 acetilado (Figura 10) en toros LF se asocian con una estructura de cromatina más suelta, con menor número de protaminas, lo que conduce a anomalías en la morfología molecular del espermatozoides y su función.



**Figura 10:** Medición por citometría de flujo de los niveles de H4 acetilada en toros HF (A) y LF (B). El cuadrante Q1 refleja los espermatozoides H4 acetil positivos; El cuadrante Q4 los espermatozoides US. Fuente: Ugur *et al.* (2019).

Los resultados positivos obtenidos en los ensayos mencionados abren la puerta a la aplicación de estas técnicas en especies tan importantes económicamente como el cerdo, implicando numerosos beneficios en la detección temprana de los individuos más aptos para la producción y la IA.

## 9. PERSPECTIVAS PARA LA APLICACIÓN DE ESTAS TÉCNICAS EN GANADO PORCINO Y BENEFICIOS

Si bien el estilo de vida de cada individuo claramente afecta la salud y la esperanza de vida a nivel individual, estudios epidemiológicos recientes han proporcionado evidencia de que el estilo de vida de una generación puede modificar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas en las generaciones posteriores, a través de los llamados efectos parentales (Donkin y Barrès, 2018). En los últimos años, se han identificado biomarcadores genómicos y proteómicos para el diagnóstico de la infertilidad masculina para superar las limitaciones del análisis de semen convencional (Kang *et al.*, 2019). Entre estos novedosos métodos se encuentran los

mencionados a lo largo de este trabajo. Como se ha explicado, estos métodos solo se han aplicado de manera puntual en ciertas especies. A pesar de no ser rutinarios, en las especies aplicadas han mostrado resultados positivos y prometedores para su futura aplicación en otras especies, entre las que destacamos el cerdo. Es necesario la aplicación de técnicas rápidas de detección de los individuos con los mejores potenciales genéticos ya que el ganado porcino acapara la mayor producción de carne en España, con 4530,5 toneladas de carne producida anualmente. Le sigue la carne de aves de corral con una producción de 1636,8 toneladas anuales (Eurostat, 2019). Por lo tanto, la ganadería porcina requiere una mayor atención y urgencia en cuanto a la aplicación de estas técnicas de detección de calidad espermática. Los beneficios económicos provendrían de una mayor y mejor producción de verracos sin costes añadidos, así como una disminución de las necesidades de mantenimiento de individuos infértiles o inadecuados para la IA.

La mala calidad espermática puede deberse también a otros factores como el proceso de criopreservación. Esto se debe a que produce estrés físico y químico en numerosas estructura del espermatozoide y reduce la viabilidad de los espermatozoides y la capacidad de fecundación (Hernández *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el %DFI de los espermatozoides criopreservados aumenta levemente pero significativamente tras las 96 horas de almacenamiento (Myromslien *et al.*, 2019).

Una acción conjunta, mejorando todos los aspectos mencionados anteriormente (técnicas de detección, conservación refrigerada y criopreservación), ayudarán a lograr el objetivo planteado en un futuro, optimizando los beneficios de las empresas tanto de producción de carne como de IA, en la mayoría de ocasiones estrechamente ligadas.

## 10. CONCLUSIÓN

La IA ha sido una herramienta exitosa de manejo reproductivo para mejorar la eficiencia de la producción ganadera a lo largo de los años. En el caso del ganado porcino, se logra un impacto significativo en el progreso genético mediante el uso de verracos con gran valor genético para la inseminación de hembras. El uso de los mejores individuos va a verse traducido en un aumento de la cantidad de individuos y la calidad de los mismos, lo que supondrá la obtención de mejores productos (Didion *et al.*, 2009).

A medida que la tendencia de la IA continúa siendo más eficiente, se vuelve más importante identificar al macho subfétil o infértil con la mayor anticipación posible, antes de ingresarlo al rebaño de reproducción. Por lo tanto, la identificación y el sacrificio de los machos que

producen eyaculados subfértiles permite a las industrias productoras de porcino la oportunidad de mejorar la eficiencia reproductiva general y de sus productos (Martínez, 2005).

El método principal para evaluar la calidad de los espermatozoides hasta ahora ha sido valorar parámetros clásicos como la viabilidad, motilidad, concentración y morfología, y correlacionar la información con la fertilidad masculina individual. Hay evidencia de que la fertilidad no siempre se correlaciona con la viabilidad, motilidad o concentración espermática. Por lo tanto, se necesita más información a nivel celular y molecular de los espermatozoides de machos fértiles y subfértiles para poder hacer una selección temprana de los mejores verracos para IA (Didion *et al.*, 2009). Por esta razón, a lo largo de los últimos años, se han multiplicado los experimentos que basan esta selección en la identificación de marcadores oxidativos (8-OHdG) o epigenéticos (metilaciones y acetilaciones de histonas). Estos métodos son prometedores, ya que han mostrado ser fieles a la pronta identificación de verracos fértiles e infértiles y capaces de especificar el grado de fertilidad, al contrario que los métodos tradicionales (Kang *et al.*, 2019).

## 11. REFERENCIAS

- Agarwal, A., Prabakaran, S. y Allamaneni, S. (2006) "What an andrologist/urologist should know about free radicals and why", *Urology*, 67(1), pp. 2-8.
- Agarwal, A., Rana, M., Qiu, E., AlBunni, H., Bui, A. D. y Henkel, R. (2018) "Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility", *Andrologia*. doi:10.1111/and.13126.
- Agustina, L. (2019) "El precio del porcino sube un 50% en el 2019 y sacude los cimientos del sector", *La Vanguardia*. Disponible en: <https://www.lavanguardia.com/economia/20191209/472119205328/cerdos-industria-porcino-cataluna-espana-crisis-china.html> (Accedido: 23 de abril de 2020).
- Aitken, R. J., Bronson, R., Smith, T. B. y De Iuliis, G. N. (2013) "The source and significance of dna damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies", *Molecular human reproduction*, 19(8), pp. 475-485.
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J. y Gharagozloo, P. (2016) "Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa", *Reproduction, fertility and development*, 28(1-2), pp. 1-10.
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Mitchell, L. A., Lambourne, S. R., Connaughton, H. S. y De Iuliis, G. N. (2012) "Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols", *Biology of reproduction*, 87(5), pp. 1-11.
- Aitken, R. J., Jégou, B., Skakkebaek, N. E., Eliasson, R. y Jørgensen, N. (2006) "Sperm function tests and fertility", *International journal of andrology*, 29(1), pp. 69-75.
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A. y De Iuliis, G. N. (2014) "Oxidative stress and male reproductive health", *Asian journal of andrology*, 16(1), pp. 31-38.
- Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M. y Carrell, D. T. (2005) "DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm", *Journal of andrology*, 26(6), pp. 741-748.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston Robert E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1992) *Short protocols in molecular biology*. 2.<sup>a</sup> ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.

- Balanya, M. (2019) "El sector porcino español se convierte en el segundo suministrador de China", *ABC*. Disponible en: [https://www.abc.es/economia/abci-sector-porcino-espanol-convierte-segundo-suministrador-china-201909101440\\_noticia.html](https://www.abc.es/economia/abci-sector-porcino-espanol-convierte-segundo-suministrador-china-201909101440_noticia.html) (Accedido: 23 de abril de 2020).
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Couté, Y., Puthier, D., Buchou, T., Boussouar, F., Urahama, T., Fenaille, F., Curtet, S., Héry, P., Fernandez-Nunez, N., Shiota, H., Gérard, M., Rousseaux, S., Kurumizaka, H. y Khochbin, S. (2017) "Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells", *Molecular cell*, 66(1), pp. 89-101.
- Bisht, S. y Dada, R. (2017) "Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies", *Frontiers in bioscience*, 9(1), pp. 420-447.
- Bochenek, M., Smorag, Z. y Pilch, J. (2001) "Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination", *Theriogenology*. doi:10.1016/s0093-691x(01)00588-x.
- Burton, A. y Torres-Padilla, M. E. (2014) "Chromatin dynamics in the regulation of cell fate allocation during early embryogenesis", *Nature reviews molecular cell biology*, 15(11), pp. 722-734.
- Carlberg, C. y Molnár, F. (2016) *Mechanisms of gene regulation*. 2.<sup>a</sup> ed. Dordrecht: Springer.
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J. y Carrell, D. T. (2006) "Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm", *Journal of andrology*, 27(1), pp. 53-59.
- Dabrowska, N. y Wiczkowski, A. (2017) "Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage", *Advances in clinical and experimental medicine*, 26(1), pp. 155-166.
- Didion, B. A., Kasperson, K. M., Wixon, R. L. y Evenson, D. P. (2009) "Boar fertility and sperm chromatin structure status: A retrospective report", *Journal of andrology*, 30(6), pp. 655-660.
- Dogan, S., Vargovic, P., Oliveira, R., Belser, L. E., Kaya, A., Moura, A., Sutovsky, P., Parrish, J., Topper, E. y Memili, E. (2015) "Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls", *Biology of reproduction*. doi:10.1095/biolreprod.114.124255.
- Donkin, I. y Barrès, R. (2018) "Sperm epigenetics and influence of environmental factors", *Molecular metabolism*, 14(2018), pp. 1-11.
- Doshi, S. B., Khullar, K., Sharma, R. K. y Agarwal, A. (2012) "Role of reactive nitrogen species in male infertility", *Reproductive biology and endocrinology*, 10(109), pp. 1-11.
- Dyck, M. K., Foxcroft, G. R., Novak, S., Ruiz-Sanchez, A., Patterson, J. y Dixon, W. T. (2011) "Biological markers of boar fertility", *Reproduction in domestic animals*, 46(2), pp. 55-58.
- España (2020) "Real Decreto Ley 10/2020, de 29 de marzo, Real Decreto-ley 10/2020, de 29 de marzo, por el que se regula un permiso retribuido recuperable para las personas trabajadoras por cuenta ajena que no presten servicios esenciales, con el fin de reducir la movilidad de la población en el contexto de la lucha contra el COVID-19", *Boletín Oficial del Estado*, (87, 29 de marzo), pp. 27629-27636. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2020/03/29/pdfs/BOE-A-2020-4166.pdf>.
- Eurostat (2019) *Agricultural production - livestock and meat*. Disponible en: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural\\_production\\_-\\_livestock\\_and\\_meat](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat) (Accedido: 15 de mayo de 2020).
- Evans, T. C. (1947) "Effects of hydrogen peroxide produced in the medium by radiation on spermatozoa of *Arbacia punctulata*", *Bulletin*, 92(2), pp. 99-109.
- Evenson, D. P. (2016) "The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility", *Animal reproduction science*, 169(2016), pp. 56-75.
- Evenson, D. P., Larson, K. L. y Jost, L. K. (2002) "Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques", *Journal of andrology*, 23(1), pp. 25-43.
- Evenson, D. P., Zarzynkiewicz, Z. y Melamed, M. R. (1980) "Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility", *Science*, 5(1), pp. 1131-1133.



- Flores, E., Ramió-Lluch, L., Bucci, D., Fernández-Novell, J. M., Peña, A. y Rodríguez-Gil, J. E. (2011) "Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm", *Theriogenology*, 76(8), pp. 1450-1464.
- Gharagozloo, P., Gutierrez-Adán, A., Champroux, A., Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., Perez-Cerezales, S., Pericuesta, E., Polhemus, A., Moazamian, A., Drevet, J. R. y Aitken, R. J. (2016) "A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models", *Human reproduction*, 31(2), pp. 252-262.
- González-Marín, C., Gosálvez, J. y Roy, R. (2012) "Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells", *International journal of molecular sciences*, 13(11), pp. 14026-14052.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H. y Darzynkiewicz, Z. (1993) "Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells", *Experimental cell research*, 207(1), pp. 202-205.
- Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gouraud, A. y Holt, W. V. (2011) "Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species", *Molecular reproduction and development*, 78(12), pp. 951-961.
- Guthrie, H. D. y Welch, G. R. (2012) "Effects of reactive oxygen species on sperm function", *Theriogenology*, 78(8), pp. 1700-1708.
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Hammoud, A. O., Gibson, M., Cairns, B. R. y Carrell, D. T. (2011) "Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men", *Human reproduction*, 26(9), pp. 2558-2569.
- Hernández, M., Roca, J., Ballester, J., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., Johannisson, A., Saravia, F. y Rodríguez-Martínez, H. (2006) "Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability", *International journal of andrology*, 29(6), pp. 583-591.
- Interporc (2018) *El papel del sector porcino en la economía de España*. Disponible en: <https://interporc.com/2018/11/14/papel-sector-porcino-en-economia-espanola?cat=blog/el-ayer-y-hoy-del-cerdo> (Accedido: 17 de junio de 2020).
- De Iuliis, G. N., Thomson, L. K., Mitchell, L. A., Finnie, J. M., Koppers, A. J., Hedges, A., Nixon, B. y Aitken, R. J. (2009) "DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a marker of oxidative stress", *Biology of reproduction*, 81(3), pp. 517-524.
- Kang, S., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Song, W. H., Rahman, M. S., Park, Y. J. y Pang, M. G. (2019) "Porcine seminal protein-I and II mRNA expression in boar spermatozoa is significantly correlated with fertility", *Theriogenology*, 138(2019), pp. 31-38.
- Kleiman, S. E., Bar-Shira Maymon, B., Hauser, R., Botchan, A., Paz, G., Yavetz, H. y Yogev, L. (2008) "Histone H4 acetylation and AZFc involvement in germ cells of specimens of impaired spermatogenesis", *Fertility and sterility*, 89(6), pp. 1728-1736.
- Kutchy, N. A., Menezes, E. S. B., Chiappetta, A., Tan, W., Wills, R. W., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., Perkins, A. D. y Memili, E. (2018) "Acetylation and methylation of sperm histone 3 lysine 27 (H3K27ac and H3K27me3) are associated with bull fertility", *Andrologia*. doi:10.1111/and.12915.
- Lewis, S. E. M., Aitken, R. J., Conner, S. J., De Iuliis, G., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman G. A. y Gharagozloo, P. (2013) "The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: Recent advances in diagnosis and treatment", *Reproductive biomedicine online*. doi:10.1016/j.rbmo.2013.06.014.
- Martínez, F. A. (2005) *Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract*. Tesis doctoral. University of Veterinary Medicine Hannover.
- Maté, V. (2020) "Las granjas también sufren la cuarentena", *El País*. Disponible en: <https://elpais.com/economia/2020-03-31/las-granjas-tambien-sufren-la-cuarentena.html> (Accedido: 23 de abril de 2020).

Menkveld, R. (2010) "Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen", *Asian journal of andrology*, 12(1), pp. 47-58.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2019a) *El sector de la carne porcina en cifras*. Madrid.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (2019b) *Sector porcino en España*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/va/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/> (Accedido: 23 de enero de 2020).

Mitchell, L. A., De Iuliis, G. N. y Aitken, R. J. (2011) "The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compaction and cell vitality: Development of an improved methodology", *International journal of andrology*, 34(1), pp. 2-13.

Moazamian, R., Polhemus, A., Connaughton, H., Fraser, B., Whiting, S., Gharagozloo, P. y Aitken, R. J. (2015) "Oxidative stress and human spermatozoa: Diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation", *Molecular human reproduction*, 21(6), pp. 502-515.

Myromslien, F. D., Tremoen, N. H., Andersen-Ranberg, I., Fransplass, R., Stenseth, E. B., Zeremichael, T. T., van Son, M., Grindflek, E. y Gaustad, A. H. (2019) "Sperm DNA integrity in Landrace and Duroc boar semen and its relationship to litter size", *Reproduction in domestic animals*, 54(2), pp. 160-166.

De Oliveira, R. V., Dogan, S., Belser, L. E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G. y Memili, E. (2013) "Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility", *Reproduction*, 146(3), pp. 263-272.

Pacher, P., Beckman, J. S. y Liaudet, L. (2007) "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease", *Physiol review*, 87(1), pp. 315-424.

Park, Y. J., Kim, J., You, Y. A. y Pang, M. G. (2013) "Proteomic revolution to improve tools for evaluating male fertility in animals", *Journal of proteome research*, 12(11), pp. 4738-4747.

Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J. M., Burgess, S. C. y Memili, E. (2008) "Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility", *BMC systems biology*. doi:10.1186/1752-0509-2-19.

Pérez Peña, E. (2020) *Atención integral de la infertilidad*. 4.ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Pierce, B. A. (2014) *Genetics: A conceptual approach*. 5.ª ed. New York: W.H. Freeman and Company. doi:978-84-9835-733-2.

Rahman, K. (2007) "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors", *Clinical interventions in aging*, 2(2), pp. 219-236.

Rahman, M. S., Kwon, W. S. y Pang, M. G. (2017) "Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa", *Molecular reproduction and development*, 84(9), pp. 749-759.

Rex, A. S., Aagaard, J. y Fedder, J. (2017) "DNA fragmentation in spermatozoa: A historical review", *Andrology*, 5(4), pp. 622-630.

Roca, J., Broekhuijse, M. L. W. J., Parrilla, I., Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A. y Bolarin, A. (2015) "Boar differences in artificial insemination outcomes: Can they be minimized?", *Reproduction in domestic animals = zuchthygiene*, 50(2), pp. 48-55.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R. K., Thomas, A. J., Nada, E. A., Evenson, D. P. y Alvarez, J. G. (2002) "Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa", *Fertility & sterility*, 78(6), pp. 1215-1224.

Serafini, R., Varner, D. D., Blanchard, T. L., Teague, S. R., LaCaze, K. y Love, C. C. (2018) "Effects of seminal plasma and flash-freezing on DNA structure of stallion epididymal sperm exposed to different potentiators of DNA damage", *Theriogenology*, 117(2018), pp. 34-39.

Shamsi, M. B., Imam, S. N. y Dada, R. (2011) "Sperm DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(11), pp. 1073-1085.

- Simon, L., Lutton, D., McManus, J. y Lewis, S. E. M. (2011) "Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success", *Fertility and sterility*, 95(2), pp. 652-657.
- Soria-Meneses, P. J., Jurado-Campos, A., Montoro, V., Soler, A. J., Garde, J. J. y Fernández-Santos, M. del R. (2019) "Ovine sperm DNA oxidation quantification using an 8-OHdG immunodetection assay", *Reproduction in domestic animals*, 54(S4), pp. 59-64.
- Štiavnická, M., García-Álvarez, O., Ulčová-Gallová, Z., Sutovsky, P., Abril-Parreño, L., Dolejšová, M., Řimnáčová, H., Moravec, J., Hošek, P., Lošan, P., Gold, L., Fenclová, T., Králíčková, M. y Nevoral, J. (2019) "H3K4me2 accompanies chromatin immaturity in human spermatozoa: An epigenetic marker for sperm quality assessment", *Systems biology in reproductive medicine*. doi:10.1080/19396368.2019.1666435.
- Tang, M. C. W., Jacobs, S. A., Mattiske, D. M., Soh, Y. M., Graham, A. N., Tran, A., Lim, S. L., Hudson, D. F., Kalitsis, P., O'Bryan, M. K., Wong, L. H. y Mann, J. R. (2015) "Contribution of the two genes encoding histone variant H3.3 to viability and fertility in mice", *PLoS genetics*, 11(2), pp. 1-23.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S. y Murata, M. (2014) "Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer", *International journal of molecular sciences*, 16(1), pp. 193-217.
- Ugur, M. R., Kutchy, N. A., Menezes, E. B., Ul-Husna, A., Haynes, B. P., Uzun, A., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A. y Memili, E. (2019) "Retained acetylated histone four in bull sperm associated with fertility", *Frontiers in veterinary science*, 6(223), pp. 1-10.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. y Fiotakis, C. (2009) "8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis", *Journal of environmental science and health*, 27(2), pp. 120-139.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. y Telser, J. (2007) "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *International journal of biochemistry and cell biology*, 39(1), pp. 44-84.
- Vorilhon, S., Brugnion, F., Kocer, A., Dollet, S., Bourgne, C., Berger, M., Janny, L., Pereira, B., Aitken, R. J., Moazamian, A., Gharagozloo, P., Drevet, J. y Pons-Rejraji, H. (2018) "Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an 8-OHdG immuno-detection assay", *Human Reproduction*, 33(4), pp. 553-562.
- World Health Organization (2020) *Sexual and reproductive health*. Disponible en: <https://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/> (Accedido: 1 de febrero de 2020).
- Wright, C., Milne, S. y Leeson, H. (2014) "Sperm DNA damage caused by oxidative stress: Modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility", *Reproductive biomedicine online*. doi:10.1016/j.rbmo.2014.02.004.
- Yang, J. Z., Ajonuma, L. C., Rowlands, D. K., Tsang, L. L., Ho, L. S., Lam, S. Y., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Chung, Y. W., Cho, C. Y., Tse, J. Y. H., James, A. E. y Chan, H. C. (2005) "The role of inducible nitric oxide synthase in gamete interaction and fertilization: A comparative study on knockout mice of three NOS isoforms", *Cell biology international*, 29(9), pp. 785-791.
- Zini, A., Albert, O. y Robaire, B. (2014) "Assessing sperm chromatin and DNA damage: Clinical importance and development of standards", *Andrology*, 2(3), pp. 322-325.