



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**DETECCIÓN DE DAÑO OXIDATIVO EN  
EL ADN DEL ESPERMATOZOIDE  
PORCINO MEDIANTE  
INMUNOCITOQUÍMICA DE 8-OHdG**


**DETECTION OF OXIDATIVE DAMAGE  
IN SWINE SPERM DNA BY 8-OHDG  
IMMUNOCYTOCHEMISTRY**

Cristina Fernández González

**GRADO EN BIOLOGÍA**

Junio, 2021

**FIRMA DEL ALUMNO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cristina', with a large, sweeping flourish underneath.

Fdo.: Cristina Fernández González

En León, a 30 de junio de 2020



Facultad de Ciencias  
Biológicas y Ambientales  
Universidad de León

TRABAJO FIN DE GRADO  
IMPRESO 3

### PROPUESTA DETALLADA PRESENTADA POR UN ESTUDIANTE

#### DATOS DEL ESTUDIANTE

Apellidos Fernández González    Nombre Cristina  
DNI/Pasaporte 71960482Z    Dirección Postal Calle Fray Luis de León, 20  
C.Postal 34800    Localidad Aguilar de Campoo    Provincia Palencia  
Teléfono 658064577    E-mail cferng16@estudiantes.unileon.es  
Grado en Biología    Curso Académico 4º

#### TÍTULO DEL TRABAJO

Detección de modificaciones epigenéticas en las histonas del espermatozoide porcino

#### DATOS DEL TUTOR

D. FELIPE MARTINEZ PASTOR    DNI 12776847W  
Departamento/Área BIOLOGIA MOLECULAR/ BIOLOGÍA CELULAR

#### LUGAR DE REALIZACIÓN

INDEGSAL

#### BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO

Las alteraciones de la cromatina espermática constituyen un problema crítico para la fertilidad. El cerdo es una especie muy útil tanto como modelo biomédico como por su interés económico. En este trabajo se utilizarán técnicas de inmunomarcaje para determinar alteraciones en las histonas del núcleo del espermatozoide porcino, principalmente en la H3 y relacionadas con su posible acetilación y metilación.

León, a 6 de julio de 2020

EL ESTUDIANTE

Fdo.: Dña. Cristina Fernández González

VºBº EL TUTOR

MARTINEZ  
PASTOR FELIPE -  
12776847W  
Fdo.: D. Felipe Martínez Pastor

Firmado digitalmente por  
MARTINEZ PASTOR FELIPE -  
12776847W  
Fecha: 2020.07.06 16:04:53  
+02'00'

VºBº EL DIRECTOR DEL INDEGSAL

CHAMORRO ALVAREZ  
CESAR ANGEL -  
09733211W  
Fdo.: D. César A. Chamorro Álvarez

Firmado digitalmente por  
CHAMORRO ALVAREZ CESAR  
ANGEL - 09733211W  
Fecha: 2020.07.08 13:19:10 +02'00'

COMISIÓN DE TRABAJO FIN DE GRADO

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. SITUACIÓN ECONÓMICA DEL SECTOR PORCINO .....	1
1.2. CROMATINA ESPERMÁTICA.....	3
1.3. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD.....	5
1.3.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	7
1.3.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDES.....	7
1.4. MÉTODOS TRADICIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.....	8
1.4.1. TUNEL.....	9
1.4.2. SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA).....	9
1.4.3. COMET.....	10
1.5. ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG .....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. REACTIVOS Y MEDIOS.....	13
3.1.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	13
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
3.2.1. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES .....	15
3.2.2. INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG .....	17
3.2.3. ANÁLISIS DE IMAGEN.....	18
3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. RESULTADOS DE LA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES .....	19
4.2. RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG .....	20
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>27</b>
ANEXO I: PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE IMÁGENES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN IMAGEJ .....	31
ANEXO II: CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS DE INMUNODETECCIÓN DE LA 8-OHdG .....	32
ANEXO III: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE INMUNODETECCIÓN DE LA 8-OHdG EN BASE A LOS RESULTADOS DE ESTE TFG .....	35

## RESUMEN

El ganado porcino tiene una gran importancia económica, y su producción se basa principalmente en la inseminación artificial. El objetivo de este trabajo es la optimización y puesta a punto del protocolo de inmunodetección de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Un marcador temprano de la oxidación del ADN. La 8-OHdG permite detectar el daño del ADN causado por el estrés oxidativo que puede no ser detectado por métodos clásicos de evaluación de muestras espermáticas, y que constituye una de las principales causas de infertilidad masculina. El fin último que se persigue es su aplicación en citometría de flujo para evaluar miles de células por segundo.

Se realizaron varios tratamientos empleando diferentes combinaciones de reactivos, concentraciones y tiempos de incubación, mediante la técnica de inmunocitoquímica. Las muestras espermáticas se observaron en un microscopio de fluorescencia y posteriormente fueron analizadas con el programa ImageJ para cuantificar la intensidad de fluorescencia. Atendiendo a los resultados obtenidos, las muestras espermáticas que presentaron mayor fluorescencia fueron las procesadas con el tratamiento de descondensación con 10 mM DTT y permeabilización con Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%. Habiendo comprobado los buenos resultados de esta técnica, el siguiente paso sería analizar muestras espermáticas de verracos y correlacionarlos con sus datos de fertilidad, evaluando si tiene mayor valor predictivo que las técnicas tradicionales, siendo entonces muy útil para los centros de inseminación, que podrían identificar de manera temprana los verracos subfértiles, reduciendo costes.

**Palabras clave:** 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, daño espermático, espermatozoide porcino, estrés oxidativo, ImageJ, protamina.

## ABSTRACT

Swine livestock is economically important, and their production is mainly based on artificial insemination. The objective of this work is the tune-up of the immunodetection protocol for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). An early marker of DNA oxidation. 8-OHdG makes it possible to detect DNA damage caused by oxidative stress that may not be detected by classical sperm sample evaluation methods, and it is one of the main causes of male infertility. The last goal is its application in flow cytometry to assess thousands of cells per second.

Several treatments were carried out using different combinations of reagents, concentrations, and incubation times, using the immunocytochemistry technique. The sperm samples were observed on a fluorescence microscope and, afterwards, were analyzed using the ImageJ program to quantify the fluorescence intensity. Based on the results obtained, the sperm samples that showed a higher fluorescence were those processed by the descondensation treatment with 10 mM DTT and 0.1% sodium citrate in 0.1% Triton permeabilization. After verifying the good results of this technique, the next step could be to analyze boar sperm samples and correlate the results with their fertility data, evaluating whether it has a higher predictive value than traditional techniques. Then, it will be useful for insemination centers, because they could identify subfertile boars early, reducing costs.

**Keywords:** 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine, sperm damage, swine sperm, oxidative stress, ImageJ, protamine.

## ABREVIATURAS

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

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

Anticuerpo: Ac.

APE: Endonucleasa de sitios abásicos.

BER: Vía de reparación de escisión de bases.

DFI: Índice de fragmentación de ADN.

HO: Radical hidroxilo.

Hoechst 33342: H342.

IA: Inseminación artificial.

INDEGSAL: Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal.

LPO: Peroxidación lipídica.

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

OGG-1: 8-oxoguanina glicosilasa 1.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

RNS: Especies reactivas de nitrógeno.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay*.

SDF: Fragmentación del ADN espermático.

TA: Temperatura ambiente.

TNE: Tris/NaCl/EDTA.

TUNEL: *Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling*.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La inseminación artificial (IA) porcina tiene su origen en las primeras décadas del siglo XX. La primera IA fue realizada en 1780 en una perra por el fisiólogo Lázaro Spallanzani. Tras 100 años esta técnica pasó a aplicarse en conejos, perros y caballos, según reportaron Heape y otros investigadores de diversos países (Giraldo Giraldo, 2019). Fue en los años 40 en Estados Unidos cuando la IA se comenzó a desarrollar en bovinos lecheros y desde entonces, se ha generado un avance notable en la aplicación y desarrollo de la técnica (Gadea, 2019).

En lo referente a un sistema de producción porcina mediante IA, un cerdo puede inseminar a cientos de cerdas durante su vida reproductiva, por lo que la fertilidad de los machos reproductores es un factor relevante que contribuye a la eficiencia reproductiva del rebaño. De este modo, la subfertilidad de un solo verraco puede influir negativamente sobre los resultados reproductivos de un elevado número de cerdas (Diether, 2015).

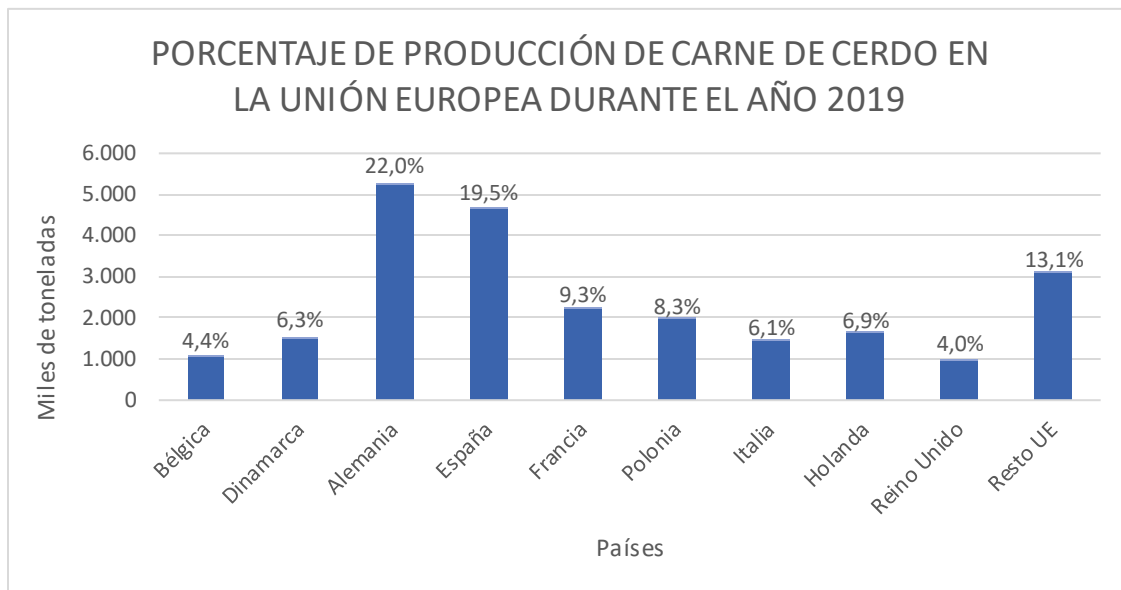
Además, una mayor calidad del semen no se relaciona directamente con una elevada fertilidad, por lo que no basta con una detección de baja motilidad, concentración o formas anormales de los espermatozoides. Por ello, es relevante que los centros de IA complementen los espermogramas actuales con un análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que niveles elevados provocan daños en el ADN espermático, generando a su vez infertilidad masculina (Kutchy *et al.*, 2018; Roca *et al.*, 2016).

### **1.1. SITUACIÓN ECONÓMICA DEL SECTOR PORCINO**

El sector porcino tiene un papel clave en la economía española, ya que representa el 2% del PIB nacional y el 16,2% de la Producción Final Agraria. Asimismo, contribuye en un 42% a la Producción Final Ganadera (INTERPORC, 2020). España se sitúa mundialmente como el cuarto país productor de carne de porcino, ocupando el primer puesto China, seguido de EEUU y Alemania. Dentro de la Unión Europea, España se posiciona en segundo lugar con un 19,5% de la producción comunitaria (Gráfica 1). Los datos de sacrificio del MAPA del año 2019 estiman una producción porcina de unos 4,6 millones de toneladas y unos 52,9 millones de animales sacrificados; incrementando la producción en un 1% de toneladas durante ese año (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

En contraposición a lo esperado para el año 2020 debido a la pandemia provocada por SARS-CoV-2, las exportaciones españolas de porcino a China se incrementaron en más de un 116% entre los meses de enero a septiembre, alcanzando un total de 1.000.000 toneladas en

octubre del año pasado (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020). Este incremento de la producción provocó que la demanda de carne de cerdo se esté incrementando en todo el mundo (Roca *et al.*, 2016).



**Gráfica 1:** Porcentaje de producción de carne de cerdo en la Unión Europea durante el año 2019. Fuente: Adaptación de EUROSTAT y SG Análisis, Coordinación y Estadística (MAPA).

La tecnología de reproducción asistida más utilizada actualmente por tratarse de la menos invasiva es la inseminación artificial (IA), que se utiliza con éxito para la cría de ganado doméstico en todo el mundo (Rahman *et al.*, 2017). La IA comercial porcina tuvo sus inicios hace más de 50 años, pero durante los primeros años la eficacia predominó sobre la eficiencia. Esto es debido a que en un comienzo se utilizó como una herramienta para prevenir la propagación de enfermedades venéreas en vez de como un medio para acelerar el progreso genético. Además, muchas de las dosis de IA comerciales actuales derivan de mezclas de semen de varios verracos, lo que dificulta aún más el progreso genético (Roca *et al.*, 2016). La mejora genética se puede explotar para incrementar la producción y garantizar de este modo un ahorro económico en el sector (Rahman *et al.*, 2017).

El espermograma estandarizado utilizado en los centros de IA (que incluye el número de espermatozoides, motilidad y morfología) es apto para identificar verracos y eyaculados con deficiencias sustanciales de fertilidad, pero no es capaz de identificar verracos subfértiles, por lo que aproximadamente el 6% de estos permanecen “ocultos”, lo que podría dar lugar a pérdidas reproductivas y económicas. Por todo esto, los centros de IA deberían complementar los espermogramas actuales con nuevos biomarcadores moleculares de fertilidad y calidad del



semen para la identificación temprana de los verracos subfértiles, antes de incorporarlos a los programas comerciales de IA (Roca *et al.*, 2016).

## 1.2. CROMATINA ESPERMÁTICA

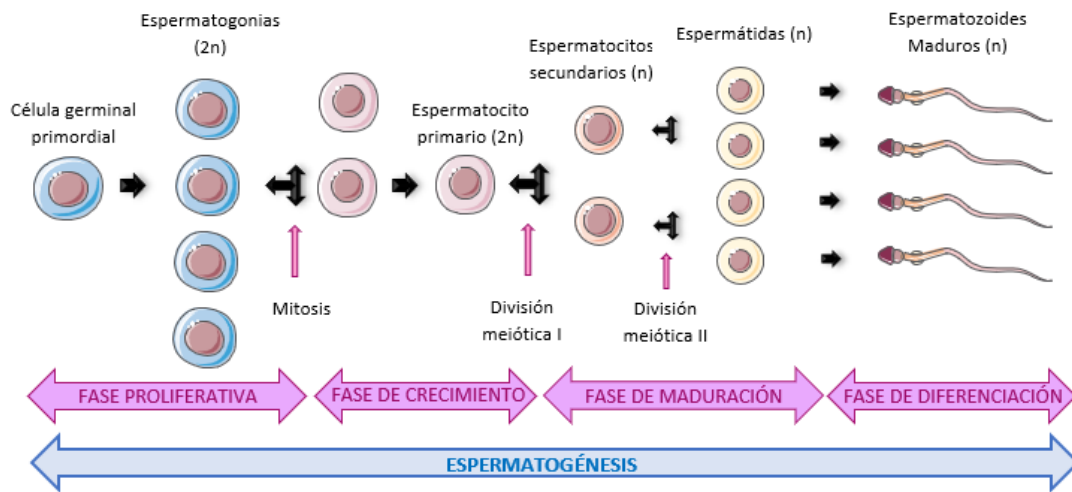
El ADN en eucariontes se encuentra estrechamente asociado con proteínas histonas y no histonas. A este complejo de ambas clases de proteínas con el ADN nuclear se le denomina cromatina (Alberts *et al.*, 2011). Las histonas son pequeñas proteínas que se encuentran asociadas con el ADN del genoma eucariota y contienen abundantes aminoácidos básicos, como la arginina y la lisina, con carga positiva (Chicano, 2015). Por tanto, las histonas presentan carga eléctrica positiva, que interactúa con las cargas negativas de los fosfatos del ADN mediante fuerzas electrostáticas y mantiene al ADN en contacto con las histonas (Benito Jiménez y Espino Nuño, 2013).

La cromatina se puede clasificar en diferentes niveles de organización. El primer nivel corresponde a la estructura de doble hélice del ADN. En un nivel superior el ADN interactúa con proteínas (histonas) para dar lugar a los nucleosomas y forma una fibra de 10 nm. A continuación, los nucleosomas se pliegan y crean una fibra de 30 nm de ancho, que se comprime hasta formar una fibra de 250 nm de ancho. Finalmente, el enrollamiento de esta fibra de 250 nm da lugar a la cromátida de un cromosoma (Pierce, 2016).

La cromatina de los espermatozoides se diferencia de la cromatina de las células somáticas en que posee una estructura y organización muy diferentes. Esta organización única surge del proceso denominado espermatogénesis. La espermatogénesis se define como el proceso por el cual las células germinales primitivas denominadas espermatogonias se transforman en espermatozoides (Figura 1). La primera fase de la espermatogénesis, fase proliferativa, se basa en la duplicación de las células germinales: las espermatogonias ( $2n$ ). Estas células se dividen y tras varias divisiones mitóticas dan lugar a espermátocitos primarios ( $2n$ ), fase de crecimiento. La tercera fase es la de maduración, en la que cada espermátocito primario mediante división meiótica forma dos espermátocitos secundarios haploides ( $n$ ), que a su vez dan lugar a cuatro espermátidas haploides ( $n$ ) mediante otra división meiótica. La última fase es la denominada fase de diferenciación y se basa en la transformación de espermátidas ( $n$ ) a espermatozoides maduros ( $n$ ) (Matorras, 2008).

Mientras tienen lugar las divisiones mitóticas, debido a una citocinesis incompleta, las células espermatogénicas quedan conectadas entre sí por puentes citoplasmáticos. Dichos

puentes citoplasmáticos intercelulares facilitan el desarrollo sincronizado de las copias de células germinales (Casado Cerdeño, 2012).



**Figura 1:** Proceso de espermatogénesis. Tipos celulares y etapas. Fuente: Elaboración propia.

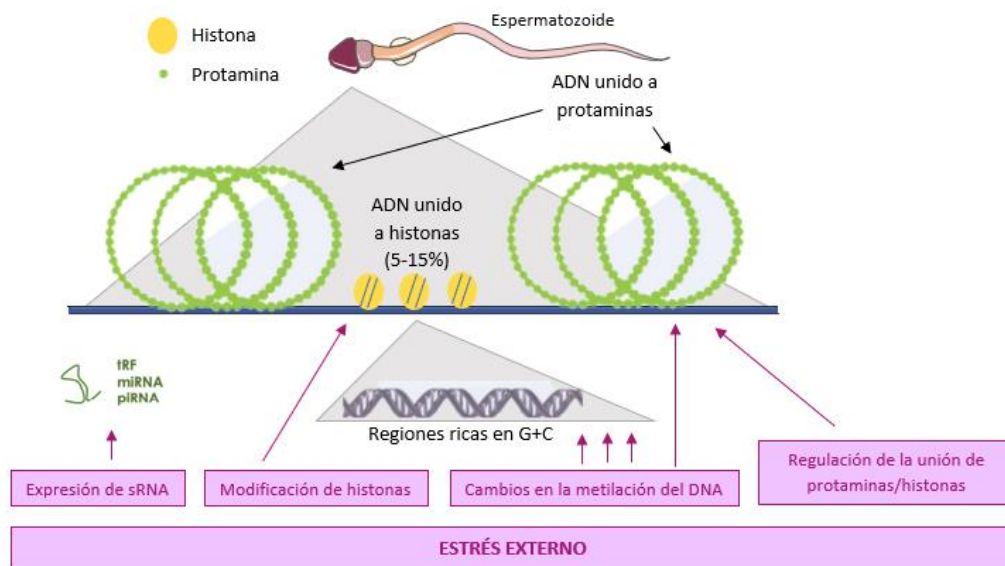
Durante la espermiogénesis tiene lugar un proceso en el que se produce un cambio de histonas por protaminas, denominado protaminación. El ADN espermático unido a las protaminas proporciona una estructura de empaquetamiento del ADN seis veces más densa y, por tanto, una mayor protección ante factores de estrés extracelulares (Figura 2).

Recientemente, se pensaba que la transición de histona a protamina en mamíferos se desarrollaba en dos etapas sucesivas. Primero, tenía lugar el reemplazo de histonas por proteínas de transición y en una segunda etapa se sustituían estas últimas por protaminas, pero más tarde se comprobó que el proceso era más complicado. Durante el paso de espermatogonias a espermátidas, al inicio de la transición, las histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4) y la histona enlazadora H1 sufren modificaciones postraduccionales que originan una inestabilidad de la cromatina. Esto hace que se fomente el desmontaje de nucleosomas y se generen roturas en el ADN que favorecen la sustitución de las variantes de las histonas por proteínas de transición y protaminas (Le Blévec *et al.*, 2020). De esta manera, la agregación de las proteínas de transición y protaminas tendría lugar de manera simultánea (Barral *et al.*, 2017).

Las proteínas de transición son proteínas nucleares básicas que se clasifican en cuatro tipos: TP1, TP2, TP3 y TP4. Las TP1 y TP2 se encuentran en todas las especies y su ausencia produce esterilidad masculina, causada por defectos de protamina y roturas del ADN (Le Blévec *et al.*, 2020). Las protaminas son proteínas nucleares ricas en residuos de arginina y cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares, generando una mayor

estabilidad, protección y compactación de la cromatina espermática (Vicenta Paparella *et al.*, 2015). Existen tres tipos: protamina 1 (P1), protamina 2 (P2) y protamina 3 (P3), aunque solo las dos primeras colaboran en la compactación del ADN espermático (Le Blévec *et al.*, 2020). Las P1 están presentes en todos los vertebrados, mientras que las P2 solo se encuentran en algunas especies de mamíferos (humanos, ratones y caballos) (Soria-Meneses *et al.*, 2019).

Se estima que se elimina del 85 al 95% de histonas, según la especie (Donkin y Barrès, 2018). Las histonas retenidas se ubican en sitios CpG hipometilados (Figura 2) correspondientes a promotores y genes relevantes para la embriogénesis (como grupos de genes *Homeobox* o genes de globina). El porcentaje de histonas retenidas (canónicas o variantes) no constituyen un defecto en el reemplazo de histonas por protaminas, sino que tienen una función importante que desempeñar, ya que portan marcas epigenéticas que se transfieren al embrión y podrían estar implicadas en el desarrollo embrionario (Le Blévec *et al.*, 2020).



**Figura 2:** Descripción general de las marcas epigenéticas susceptibles de ser generadas con estrés externo. Fuente: Adaptación de Donkin y Barrès (2018).

### 1.3. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se entiende la infertilidad como una enfermedad del aparato reproductor masculino o femenino caracterizada por la incapacidad de lograr un embarazo después de doce meses o más de relaciones sexuales regulares sin el uso de métodos anticonceptivos. Actualmente, la infertilidad se estima que perjudica a unos 186 millones de personas en edad reproductiva en todo el mundo (World Health Organization, 2021). Algunos estudios han demostrado que los hombres representan el

20-30% de los casos de infertilidad, aunque estas cifras no representan con precisión todas las regiones del mundo (Balawender y Orkisz, 2020).

En el proceso de fecundación, tanto la integridad genética materna como paterna son esenciales para que el proceso sea exitoso. Además, la transferencia de material genético intacto por el espermatozoide es decisivo para el correcto desarrollo del embrión y el feto (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

En los últimos años, la nueva evidencia sobre el impacto de la integridad del ADN espermático en los resultados reproductivos y el desarrollo de métodos de análisis de fragmentación del ADN espermático (SDF) han abierto nuevos métodos clínicos en este campo. Independientemente de otros parámetros del semen, se pueden localizar niveles más elevados de SDF en parejas infértiles, por lo que ejerce un papel relevante en la predicción de los resultados reproductivos masculinos (Le *et al.*, 2020).

Se entiende como fragmentación del ADN espermático al conjunto de alteraciones que pueden generar roturas en la doble hélice, tanto de cadena simple como de cadena doble, así como las alteraciones que supongan modificaciones de bases nitrogenadas, proteínas que induzcan nuevas roturas de ADN o formación de aductos. En lo relativo a la especie porcina, los cerdos que presentan dichas alteraciones pueden mostrar seminogramas normales, lo que puede dificultar la identificación de estos en el contexto de la reproducción asistida (Peiró, 2012; Rodríguez, 2018).

La reparación del ADN en los espermatozoides finaliza al detenerse la transcripción y la traducción después de la espermiogénesis, por lo que los posibles daños originados en el ADN espermático durante la formación del espermatozoide maduro pasarán en el ADN del espermatozoide al ovulo fecundado. Sin embargo, se ha demostrado que los ovocitos y embriones tempranos pueden reparar algunos tipos de rotura en el ADN procedente del espermatozoide. Por tanto, el impacto del daño en el ADN espermático dependerá tanto del tipo de daño, como de la capacidad del ovocito para repararlo (González-Marín *et al.*, 2012).

La SDF puede originarse por diversos factores como el empaquetamiento anormal de la cromatina durante la espermiogénesis, o como consecuencia de la apoptosis defectuosa antes de la eyaculación. Entre los diferentes agentes o mecanismos por los cuales el ADN espermático puede verse dañado, destacaremos el estrés oxidativo producido por una acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno. (Lorences, 2009).

### **1.3.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas altamente reactivas, generalmente con radicales libres, originadas como subproductos del metabolismo del oxígeno (Castillo Paterna, 2002). Las ROS que afectan a la funcionalidad espermática son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la mayoría de radicales hidroxilos (OH) (Izquierdo *et al.*, 2009). Los radicales libres son agentes de oxidación de vida corta altamente reactivos que intervienen como intermediarios químicos sobre lípidos, carbohidratos, aminoácidos y ácidos nucleicos (Izquierdo *et al.*, 2020).

Los radicales libres, además de ROS, incluyen una subclase de compuestos que contienen nitrógeno, denominadas especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las RNS son productos nitrogenados de las sintasas de óxido nítrico (NOS), como el óxido nítrico (NO), el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) o el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que al igual que las ROS, son necesarias para llevar a cabo diversas funciones fisiológicas (Shen y Liu, 2006). Sin embargo, a concentraciones excesivas, pueden desempeñar efectos patológicos en el sistema reproductor masculino. De hecho, los RNS se han visto relacionadas en la inducción de una función deficiente de los espermatozoides, así como en la capacidad de fertilización de los mismos (Doshi *et al.*, 2012).

Las fuentes de ROS en el plasma seminal pueden ser tanto endógenas y exógenas. Las principales fuentes endógenas son los leucocitos (neutrófilos y macrófagos) y los espermatozoides inmaduros, ya que una reciente hipótesis afirma que, en la mayoría de los casos, el ADN espermático es atacado especialmente por ROS mitocondrial originado por espermatozoides funcionalmente defectuosos (Gharagozloo y Aitken, 2011). En lo relativo a las fuentes exógenas, la ingesta excesiva de alcohol y el tabaquismo junto con otros factores ambientales, como la radiación y las toxinas, también pueden aumentar los niveles de ROS en el plasma seminal (Bardaweel *et al.*, 2018).

### **1.3.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN ESPERMATOZOIDEOS**

Los espermatozoides producen ROS en cantidades fisiológicas que permiten llevar a cabo procesos como la capacitación de los espermatozoides, la reacción acrosómica y la fusión con el ovocito. Sin embargo, una producción excesiva de ROS produce estrés oxidativo seminal (Agarwal y Deepinder, 2009).

Cuando la formación de radicales libres excede la capacidad de defensa ante ellos, el balance oxidativo fracasa y se origina daño molecular. El ataque a los grupos funcionales de las proteínas genera oxidación de aminoácidos y modificación de las proteínas como fragmentación y agregación (Contreras *et al.*, 2004). Por lo tanto, el estrés oxidativo es una situación causada por una alta producción de oxidantes o un bajo nivel de antioxidantes. Esto desemboca en un desequilibrio entre los sistemas oxidante y antioxidante generando daño por radicales libres (Thanan *et al.*, 2015).

En comparación con otras células, los espermatozoides son más vulnerables al estrés oxidativo, debido a que poseen membranas plasmáticas muy ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Cambi *et al.*, 2013). De esta manera, los espermatozoides son sensibles al daño inducido por ROS que incluye un ataque oxidativo sobre los lípidos de la membrana plasmática mediado por la peroxidación lipídica (LPO). Esto conduce a una disminución del ATP intracelular, dando lugar a daño axonemal, aumento de los defectos morfológicos en la parte intermedia y baja viabilidad de los mismos (Bansal y Bilaspuri, 2011).

Por tanto, la LPO produce reacciones catalíticas autopropagables, asociadas a la pérdida de función e integración de la membrana, con efectos deletéreos sobre la capacidad fecundante del espermatozoide. De esta manera, las especies reactivas de oxígeno y la estimulación de la peroxidación lipídica son uno de los principales causantes del daño al DNA del espermatozoide, alterando la modificación de las bases nucleotídicas y aumentando los niveles de fragmentación del DNA (Nicolich *et al.*, 2013).

#### **1.4. MÉTODOS TRADICIONALES PARA EL ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO**

Los parámetros que tradicionalmente se han asociado a la fertilidad masculina se basan en la evaluación de la motilidad de los espermatozoides, el recuento total de espermatozoides en la dosis, y la morfología de los mismos (Saacke *et al.*, 2000).

De esta manera, cuando se presentaba deficiencia en alguno de estos parámetros, se consideraba al varón como infértil; o en el caso de los verracos, como un animal reproductor no válido. Durante muchos años se buscaba causalidad de la infertilidad masculina en la deficiencia en alguno de estos parámetros. Sin embargo, hay ocasiones en las cuales se obtiene un espermiograma convencional, pero el factor masculino persiste en el fallo de la inseminación (Evenson, 2016).

Por lo tanto, es de gran importancia identificar otros factores que definen a los verracos subfértiles antes de que ingresen al rebaño reproductor, mejorando de esta manera la eficiencia reproductiva (Ausejo *et al.*, 2021).

#### **1.4.1. TUNEL**

El ensayo TUNEL (*Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling*) descrito por Gavrieli *et al.* (1992), permite detectar roturas de ADN de cadena sencilla y doble mediante la acción de una transferasa terminal que incorpora nucleótidos (dUTP) marcados fluorescentemente al grupo hidroxilo libre del extremo 3'-OH de la cadena afectada. De este modo, cuantas más roturas presente el ADN, mayor será la unión de nucleótidos y, por tanto, la intensidad de fluorescencia. La cuantificación de los nucleótidos incorporados puede realizarse mediante microscopio de fluorescencia o citometría de flujo (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Lorences, 2009).

#### **1.4.2. SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA)**

En el año 1980 Evenson *et al.* desarrollaron la técnica SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), considerada como referente para el análisis de la fragmentación del ADN en el espermatozoide (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). Se basa en el principio de que la cromatina que presenta ADN fragmentado muestra una mayor susceptibilidad *in situ* a desnaturalizarse parcialmente tras aplicar un tratamiento con calor o una solución ácida (Evenson y Jost, 1994).

El grado de desnaturalización se determina mediante un tratamiento ácido seguido de una tinción con naranja de acridina, un fluorocromo que se intercala entre las cadenas dobles de ADN como un monómero emitiendo fluorescencia verde al excitarse, pero si se une al ADN de cadena sencilla emite fluorescencia de color rojo (Lorences, 2009).

Este método requiere para su análisis de citometría de flujo, cuyos detectores captan la intensidad de la relación de fluorescencia roja/fluorescencia verde de unos 5.000 espermatozoides (Peiró, 2012). El índice de fragmentación de ADN (DFI) de una muestra se describe como el cociente de la fluorescencia roja y la fluorescencia total (Lorences, 2009). Se ha estimado que en humanos presentan problemas de fertilidad individuos con un porcentaje de DFI igual o superior a un 25-30%, mientras que en cerdos es de un 6% (Kumaresan *et al.*, 2020).

### 1.4.3. COMET

La técnica COMET se introdujo en 1984 por Ostling y Johanson para visualizar el daño en el ADN en células individuales mediante electroforesis (Ostling y Johanson, 1984). En concreto, se basa en la realización de una “microelectroforesis” en gel de agarosa de celda única que posibilita la diferenciación entre roturas de cadena doble o simple de ADN dependiendo si la desnaturalización se realiza en condiciones alcalinas (pH>13) o neutras (pH 8,4) (Evenson, 2016).

Para esta prueba COMET, se incluye una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa en un portaobjetos de microscopio y se lisan con un agente reductor de los grupos sulfidrilos (como DTT) y se somete a altas concentraciones salinas para eliminar la membrana nuclear y celular, las protaminas y las histonas (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; May, 2018). El microgel se tiñe con sustancias fluorescentes y la electroforesis refleja la migración de hebras rotas del ADN hacia el ánodo, creando una “cola de cometa” cuando se observa con un microscopio de fluorescencia, de ahí su nombre. Aquellos espermatozoides que presentan daño del DNA muestran un desplazamiento notable de los fragmentos de ADN (Evenson, 2016).

### 1.5. ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG

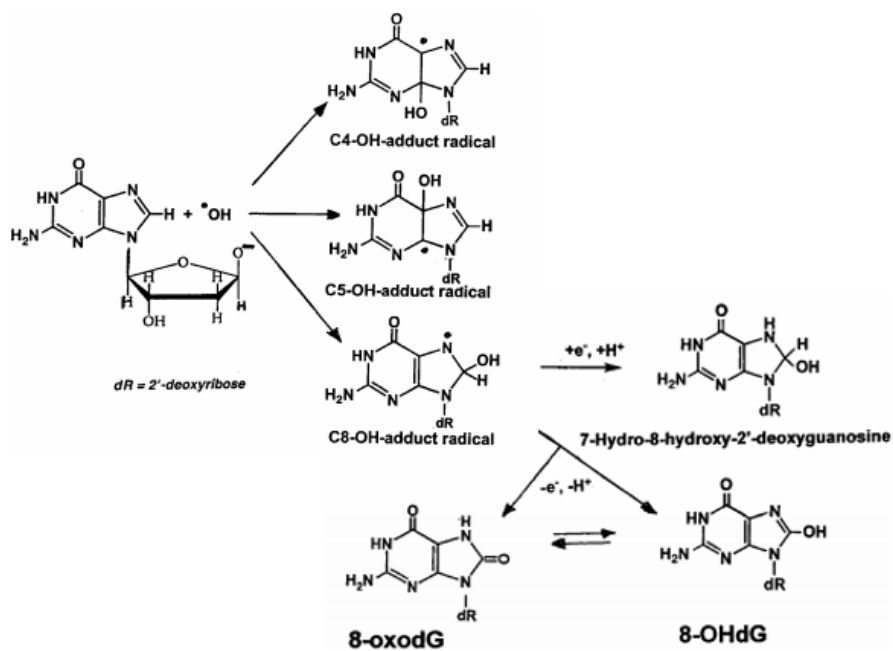
Los métodos más utilizados para evaluar el DFI de los espermatozoides son los descritos anteriormente (TUNEL, SCSA y COMET). Sin embargo, una optimización del ensayo de inmunodetección de 8-OHdG en espermatozoides porcinos podría proporcionarnos información más detallada acerca del daño del ADN espermático originado por el estrés oxidativo, el cual constituye una de las principales causas de infertilidad masculina (Soria-Meneses *et al.*, 2019).

El hecho de que el ensayo de inmunodetección de 8-OHdG pueda detectar de manera específica daños en el ADN causados por estrés oxidativo lo hace muy interesante. Hasta el momento, esta técnica se ha aplicado en especies como ratones (Gharagozloo *et al.*, 2016), verracos (Liu *et al.*, 2017), caballos (Serafini *et al.*, 2018) y humanos (Vorilhon *et al.*, 2018). Sin embargo, esta es la primera vez que se diseña un protocolo para evaluar los niveles de oxidación del ADN de espermatozoides porcinos utilizando la técnica específica de ensayo de inmunodetección de 8-OHdG analizada por citometría de flujo.



El ensayo de inmunodetección de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) se basa en la formación de aductos de bases de ADN como marcador temprano de la oxidación del ADN (Vorilhon *et al.*, 2018). La 8-OHdG es la lesión de base más abundante entre las diferentes lesiones originadas como consecuencia de un ataque oxidativo sobre el ADN espermático y origina mutaciones de transversión de G:C a T:A (Ni *et al.*, 2014).

El principal radical libre de oxígeno que ocasiona daño a las biomoléculas básicas (proteínas, lípidos de membrana y ADN) es el radical hidroxilo (HO). Los ataques del radical hidroxilo se centran preferentemente en los residuos de guanina y genera aductos radicales que, mediante la abstracción de un electrón, forma la 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG). La 8-OHdG sufre tautomería ceto-enol, lo que favorece el producto oxidado 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG) (Figura 3), considerado el mismo compuesto en la literatura científica (Valavanidis *et al.*, 2009).



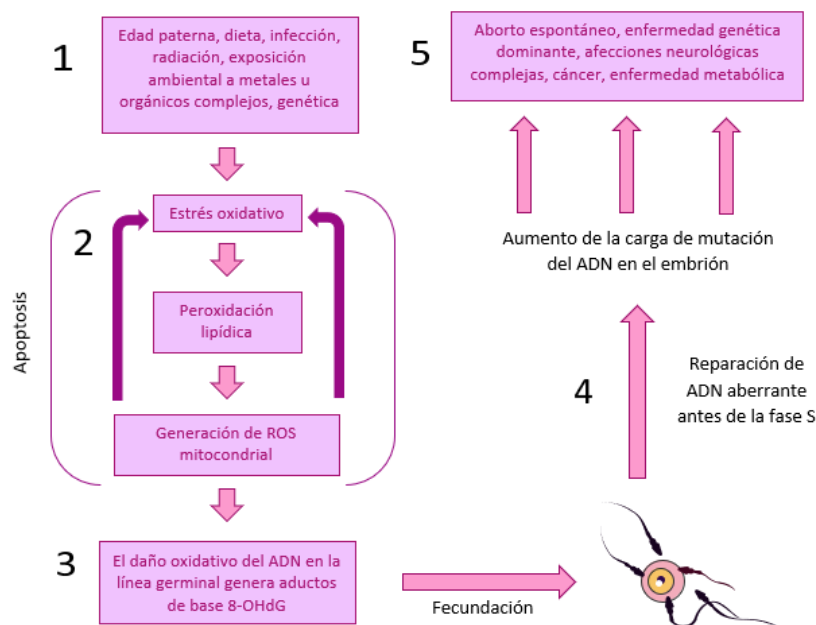
**Figura 3:** Reacción de 2-desoxiguanosina con radical hidroxilo y formación de aductos de radicales, seguido de reducción a 7-hidro-8-hidroxi-2-desoxiguanosina y posterior oxidación a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) o su tautómero 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (8-oxodG). Fuente: Valavanidis *et al.* (2009).

En el genoma de los mamíferos, se originan aproximadamente 105 lesiones de ADN por célula al día como consecuencia de errores de replicación espontáneos y del metabolismo celular (Hoeijmakers, 2009). La 8-hidroxi 2'oxoguanina es un aducto de base ocasionado durante el estrés oxidativo en el ADN de los espermatozoides y para responder a tal daño, los espermatozoides recurren a la primera enzima en la ruta de reparación de la escisión de bases

(BER), la 8-oxoguanina glicosilasa 1, OGG-1 (Aitken, 2017). Es una vía coordinada que elimina las lesiones de la base, intensificadas por desaminaciones u oxidaciones, sin distorsionar la doble hélice (Gunes *et al.*, 2015).

La vía BER comienza por el reconocimiento de una base de ADN única alterada y la posterior escisión del enlace N-glicosídico que une la base dañada con la desoxirribosa por la OGG-1 (Gunes *et al.*, 2015). Esto da lugar a la formación de “sitios abásicos” (sitios AP) apurínicos o apirimidínicos, en relación a la naturaleza de la base escindida, caracterizados por ser citotóxicos y mutagénicos (Vicente, 2014).

El siguiente paso en BER es llevado a cabo por una endonucleasa de sitios abásicos (APE), realizando una incisión del sitio AP, mediante la ruptura del enlace 5'-fosfodiéster respecto a la lesión originando una rotura del ADN de cadena sencilla, e insertando un nucleótido no modificado (Mol *et al.*, 2000; Gunes *et al.*, 2015). La mella producida de una sola hebra se procesa mediante ADN ligasa III a través de un parche corto, o mediante ADN ligasa I a través de un parche largo (Gunes *et al.*, 2015).



**Figura 4:** Impacto en la salud y el bienestar de las generaciones futuras debido al efecto del estrés oxidativo en la línea germinal masculina. Fuente: Adaptación de Aitken *et al.* (2014).

La APE1 está ausente en los espermatozoides, y los sitios apirimidínicos creados por OGG1 en el ADN de los espermatozoides dañados se reparan en la fase S de la primera división mitótica en el cigoto por el ovocito. Esto es posible porque el ovocito posee APE1, lo que permite continuar con la vía BER y la reparación efectiva del ADN tras la fecundación. Pero si

el ovocito comete un fallo en esta etapa de reparación del ADN, puede dar lugar a la creación de una mutación presente en todas las células del organismo. Esto podría explicar la variedad de patologías que se observan en la descendencia de los padres que muestran altos niveles de daño oxidativo del ADN en sus espermatozoides (Figura 4) (Aitken *et al.*, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es la puesta a punto y optimización de un protocolo que nos permita detectar la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) mediante protocolo de inmunodetección con el anticuerpo anti-8OHdG en espermatozoides porcinos. El fin último es su aplicación en citometría de flujo para evaluar el nivel de oxidación del ADN espermático, e intentar detectar verracos con alteraciones en la fertilidad por los altos niveles de oxidación, la cual precede a la fragmentación del ADN.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. REACTIVOS Y MEDIOS**

#### **3.1.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES**

Listado del stock de los reactivos y soluciones utilizados para la puesta a punto del protocolo. El proveedor fue la empresa Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), excepto si se indica lo contrario:

- Solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4)
  - NaCl (Sigma S5886)
  - KCl (Sigma P5405)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma S5136)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma P5655)
  - HCl y NaOH (Sigma H1758 y Sigma S8045) (para ajustes de pH)
- Solución de TNE
  - Tris-HCl (Sigma T5941)
  - NaCl (Sigma S9625)
  - EDTA (Sigma E1644)
- Solución salina tamponada con fosfato para inmunofluorescencia (PBS inmuno, pH 7,2)
  - NaCl (Sigma S5886)
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma S5136)

- HCl y NaOH (Sigma H1758 y Sigma S8045) (para ajustes de pH)

- Hoechst 33342 (Sigma B2261) (1 mg/ml en agua)
- Hydrogen peroxide solution 30 % (w/w) in H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma H1009)
- Trolox (Sigma 3881-3)
- BSA (Albúmina Sérica Bovina, Sigma A7906)
- Formaldehído 37% (Fisher Scientific BP531-25, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)
- Ditiotreitól (DTT; 1M, VWR A3668.0050, Radnor, Pensilvania, Estados Unidos)
- Tritón X-100 (Sigma T9284)
- Citrato trisódico dihidratado (Sigma 71402)
- Ac. directo anti 8-OHdG (FITC Anti-DNA/RNA Damage antibody [15A3] (abcam ab183393, Cambridge, Reino Unido)
- Ac. primario mouse 8-OHdG Anticuerpo 15A3 (Santa Cruz Biotechnology sc-66036, Dallas, Texas, Estados Unidos)
- Ac. secundario Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor® 488 (abcam ab150113, Cambridge, Reino Unido)
- ProLong Gold antifade (Invitrogen P10144, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos)

### **3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El estudio se desarrolló durante los meses comprendidos entre septiembre de 2020 y febrero de 2021 en la Universidad de León, en el Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) en el laboratorio de Reprobio. Para la realización de los experimentos se utilizaron muestras espermáticas criopreservadas.

Como fin de este experimento se pretendía poner a punto el protocolo de detección de 8-OHdG en citometría de flujo, pero para alcanzar este objetivo son necesarios dos pasos previos. En primer lugar, conocer si la concentración final de células que queda tras la realización de todo el protocolo llevado a cabo en placa para citometría de flujo es suficiente para poder hacer una lectura y en caso contrario, optimizarlo. En segundo lugar, comprobar que los anticuerpos comprados funcionan y optimizar todos los pasos de fijación, permeabilización, descondensación y bloqueo, así como la dilución de anticuerpo necesario para obtener esta señal en el espermatozoide.

En primer lugar, se llevó a cabo el protocolo de pérdida de células, llevando a cabo los mismos pasos que se realizarán en el protocolo de citometría de flujo. Dicho protocolo se compone de cinco centrifugaciones, por lo que se pierde un gran número de células durante su realización. El objetivo de este primer procedimiento fue obtener una concentración final de al menos  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml al final del protocolo, que es una concentración apropiada para que las células pasen a una buena velocidad durante su lectura en el citómetro. Esta prueba inicial se realizó en dos placas de 96 pocillos. En una de ellas se incluyó un paso específico de bloqueo con BSA (paso crítico para prevenir uniones no específicas de nuestro anticuerpo) y en la otra no en caso de que, omitiendo este paso, se recuperasen un mayor número de espermatozoides. En esta última se realizó el bloqueo con BSA en menor concentración en todos los pasos de lavado con PBS.

A continuación, se llevó a cabo la inmunodetección de 8-OHdG en espermatozoides porcinos en portaobjetos. Se fueron realizando distintas pruebas con diferentes concentraciones y tiempos de permeabilización (Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1% y Citrato sódico 0,5% en Triton 0,5% durante 15 y 30 minutos a temperatura ambiente) y descondensación DTT 1 mM, DTT 10 mM. Así como sus respectivos controles positivos ( $H_2O_2$ ) y negativos (Trolox y el biomarcador de 8-OHdG), haciendo diferentes combinaciones de todas estas concentraciones.

A continuación, se detallan los ensayos de recuperación de células espermáticas y de detección de la señal de la 8-OHdG con los tiempos y combinaciones elegidas.

### **3.2.1. RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS**

La recuperación de células espermáticas se llevó a cabo a partir de pajuelas de 0,25 ml de semen de cerdo. Estas se extraían rápidamente del tanque de nitrógeno líquido y se descongelaban en el baño de agua a 37 °C durante 30 segundos (Soria-Meneses *et al.*, 2019). Las dosis se encontraban a una concentración inicial de  $1000 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Se diluyó el semen en PBS para obtener una concentración final de unos  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Concentración mínima inicial de la que se parte para llevar a cabo todos los análisis de cromatina en el laboratorio de ReproBio y tener una concentración final deseable para poder llevar a cabo el análisis en el citómetro de flujo. Se comprobó la concentración con un hemocitómetro cámara de *Makler*, con un volumen de muestra de 5  $\mu$ l. La concentración inicial de las muestras se analizó mediante un microscopio óptico de contraste de fases, una

cámara digital y un programa informático de análisis seminal (ISAS, *Integrated Semen Analysis System*). A partir de aquí se inició el protocolo de recuperación de células.

En primer lugar, se pipetea 200 µl de muestra en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se añadieron 100 µl de PBS, centrifugando a  $1100 \times g$  a 4 °C durante 11 minutos para lavar y separar el diluyente de la muestra. Tras la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se calculó la concentración de espermatozoides (cámara de recuento *Makler*) para comprobar el porcentaje de pérdida espermática en este paso. Este mismo procedimiento se repite tras cada centrifugación.

Después, las células se fijaron a dos concentraciones diferentes, resuspendiendo el pellet en 150 µl de PBS-PFA 4% en dos pocillos y al 0,5% en otros dos, en ambas placas, a temperatura ambiente (TA) durante 20 min incubando en el balancín. A continuación, se lavaron con 100 µl de PBS y centrifugaron a  $1100 \times g$  a 4 °C durante 11 minutos. Se decantó el sobrenadante volcando la placa y se volvió a comprobar la concentración espermática perdida en este paso. A continuación, para permeabilizar las células, se resuspendió el pellet en 150 µl PBS con Citrato sódico 0,5% en Triton al 0,5% y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1% dejando actuar 20 minutos a TA y se volvió a lavar con 100 µl de PBS y centrifugando a  $1100 \times g$  a 4 °C durante 11 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de descondensación de la cromatina con DTT 2 mM, 10 mM y 20 mM y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Después se lavaron con 100 µl PBS y centrifugaron a  $1000 \times g$  a 4 °C durante 11 minutos, decantando posteriormente el sobrenadante.

En cuanto al proceso de bloqueo, en una de las dos placas se realizó el bloqueo añadiendo 100 µl PBS-BSA al 3% a TA durante 1 hora. Al mismo tiempo que en la otra placa el bloqueo se llevó a cabo añadiendo 0,5% de BSA al PBS en todos los pasos de lavado. Las muestras no se incubaron con el anticuerpo, así como tampoco se realizó la tinción con Hoechst33342, ya que solo nos interesa comprobar el porcentaje de pérdida y recuperación de células espermáticas. En su lugar se pone PBS en estos dos pasos llevando a cabo sus dos correspondientes lavados con 100 µl PBS y posterior centrifugación a  $1100 \times g$  a 4 °C durante 11 min, obteniendo un total de cinco centrifugaciones en una placa y de seis centrifugaciones en la otra placa.

Se repitió el protocolo en varias ocasiones realizando pequeñas variaciones. Una de estas variaciones consistía en aumentar el tiempo de centrifugación en todos los pasos de centrifugaciones de la placa ( $1100 \times g$  a 4 °C durante 15 minutos y 20 minutos). De esta manera

se comprobó si al aumentar el tiempo de centrifugación se reducía la pérdida de espermatozoides, variando en este caso solo el tiempo.

### 3.2.2. INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG

Las muestras espermáticas de porcino se descongelaron en un baño de agua (37 °C, 30 segundos). Se partió de una concentración inicial de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml, que es la concentración ideal que fijamos para poder tener un número suficiente de espermatozoides en cada campo. Cada muestra espermática se dividió en tres alícuotas: un control positivo ( $H_2O_2$ ), un control negativo (Trolox) y la muestra espermática normal. Los controles positivos se llevaron a cabo probando diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (5 M, 3 M y 1 M) y los controles negativos utilizando Trolox 1mM (Ordás *et al.*, 2013) y 10 mM, ambos siendo incubados inicialmente con las muestras (durante 30 minutos a 37 °C). Los eppendorf con la muestra espermática y con los controles positivos y negativos se centrifugaron a  $1200 \times g$  a TA durante 6 minutos. El pellet de células obtenido se resuspendió en PBS-PFA 4% para fijar las células durante 20 minutos en el balancín. Tras la fijación, las muestras se centrifugaron  $1200 \times g$  a TA durante 6 minutos y se resuspendieron en PBS inmuno para lavar las células del exceso de fijador, utilizando el mismo volumen final para mantener la concentración celular.

Después, se hizo una extensión de una gota de cada muestra (20  $\mu$ l) en su porta correspondiente y se dejaron secar 20 minutos a TA. Cuando las muestras se secaron, se hicieron tres lavados de 5 min con PBS inmuno. A continuación, se permeabilizaron las muestras espermáticas con diferentes concentraciones de permeabilización: Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1% y Citrato sódico 0,5% en Triton 0,5%, dependiendo del tratamiento utilizado. Se realizaron otros tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS inmuno. Luego, se llevó a cabo la descondensación de la cromatina espermática, utilizando ditioneitol (DTT) a diferentes concentraciones (DTT 10 mM, 20 mM y 25 mM), con su correspondiente lavado y centrifugación posterior ( $1000 \times g$  11 min 4 °C). Después, se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 1 hora y 30 minutos. Se hicieron de nuevo tres lavados de 5 minutos con PBS inmuno. Posteriormente, se añadió el anticuerpo. En este caso, se probaron dos anticuerpos: un anticuerpo directo anti 8-OHdG con FITC (ab183393) y un anticuerpo primario (sc66036). En ambos casos se comenzó por la dilución mínima recomendada que, para ambos anticuerpos, era 1/100. Los anticuerpos fueron incubados con la muestra espermática en cámara húmeda overnight a 4 °C en balancín hasta la mañana siguiente (aprox. 16h de incubación).

Pasado este tiempo, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PBS inmuno. En el caso de las muestras incubadas con el anticuerpo primario, fueron incubadas con el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse (dilución 1/500 en PBS) durante 1 h y 15 min en cámara húmeda a TA. Se volvieron a hacer 3 lavados de 5 minutos con PBS. Finalmente, se realizó la tinción con H342 a una concentración de 3  $\mu\text{l/ml}$ , dejándolo incubar a TA durante 15 minutos y haciendo un último lavado de 5 minutos con PBS inmuno. Por último, se añadió una gota de ProLong Gold antifade, colocando después el cubreobjetos. Al día siguiente se sellaron los cuatro lados del cubreobjetos con esmalte de uñas transparente. Una vez que se secó el esmalte de uñas (10-15 min, TA), las muestras se almacenaron y protegieron de la luz hasta que se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600, Tokio, Japón) con aumentos 40 $\times$ .

Las semanas posteriores se realizaron pruebas añadiendo pequeños cambios al protocolo anteriormente descrito. En el caso de los controles positivos se hicieron una gran cantidad de comprobaciones de la oxidación a diferentes concentraciones ya que según la literatura (Soria-Meneses *et al.*, 2019), se utilizó una concentración de oxidación de 8M con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Basados en estos datos se hicieron unas concentraciones iniciales de 5M, 3M y 1M. Posteriormente, se aplicaron concentraciones de 300 mM; 100 mM; 30 mM; 10 mM; 1 M; 0,01 M; 0,03 M y 0,3 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para los controles negativos, posteriormente al Trolox, se utilizó el biomarcador 8-OHdG a concentraciones de 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,3  $\mu\text{M}$ ; 0,4  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ , incubando este biomarcador con el anticuerpo directo anti 8-OHdG a TA durante 45 minutos, habiendo calculado previamente que el anticuerpo se utiliza a una concentración de 0,1 $\mu\text{M}$ .

Por último, se volvieron a realizar los tratamientos que mejores resultados obtuvieron a partir de muestras congeladas en medio tamponado TNE (Tris/NaCl/EDTA), para que los resultados fueran más precisos. Todos los procedimientos a realizar en análisis de cromatina espermática en el laboratorio Reprobio se realizaron a partir de muestras seminales congeladas a -80  $^{\circ}\text{C}$  en dicho medio.

### 3.2.3. ANÁLISIS DE IMAGEN

Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600, Tokio, Japón) con el objetivo de 40 $\times$ . Las imágenes se guardaron en formato JPG a 2880  $\times$  2048 píxeles en RGB. Para el análisis de las imágenes se empleó el software Confocal Uniovi ImageJ 1.6 para Windows de 64 bits basado en Fiji, una modificación del programa ImageJ con funciones destinadas al análisis de imágenes de Microscopía Confocal realizada por la Unidad



de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo de descarga gratuita (Universidad de Oviedo, sin fecha).

Las imágenes se analizaron mediante el programa ImageJ para cuantificar la intensidad de fluorescencia siguiendo los pasos detallados en el Anexo I (Figura 5), aplicando los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. El primer paso de este procedimiento consiste en eliminar el *background* (en caso de que exista).

### **3.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

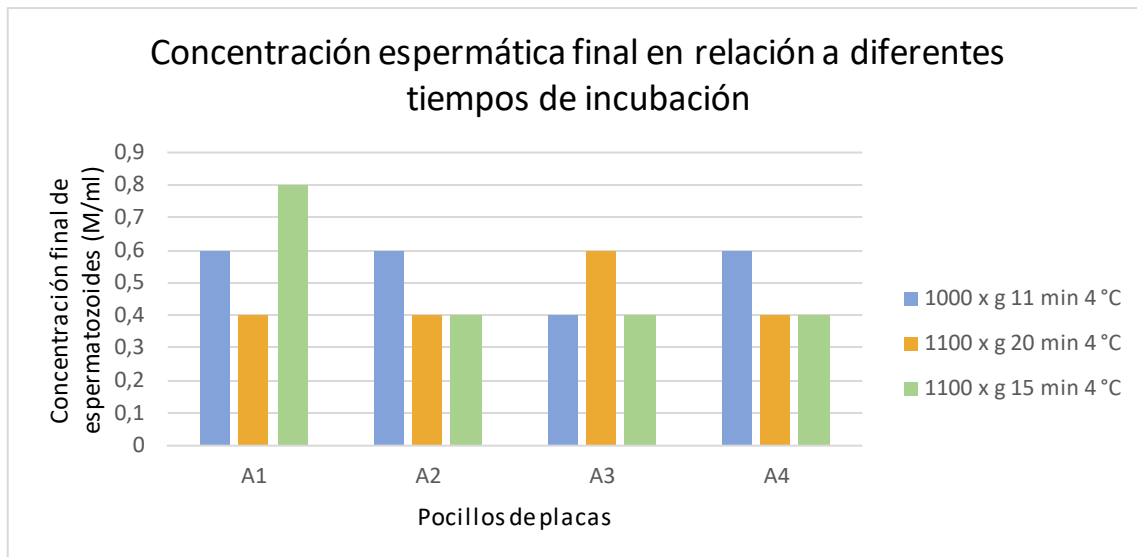
Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R (v. 4.0.4). Se analizaron y compararon los tratamientos más relevantes mediante análisis de la varianza (ANOVA). En concreto, la variable de mayor interés es la variable intensidad de fluorescencia (IntDen). Los efectos significativos se analizaron utilizando comparaciones múltiples con el test de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ . Los datos se expresaron como la media  $\pm$  la desviación estándar de la media (SD).

## **4. RESULTADOS**

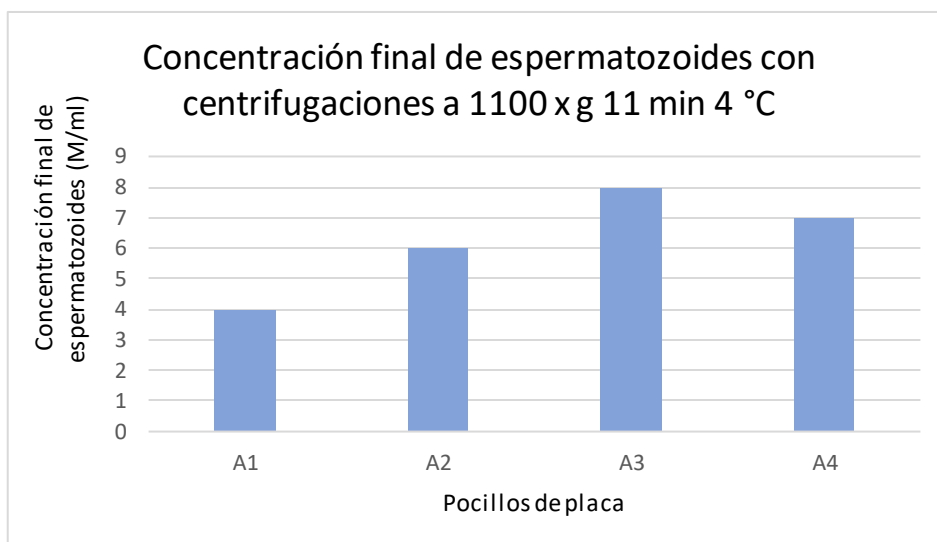
### **4.1. RESULTADOS DE LA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

Los resultados obtenidos en la prueba de recuperación de espermatozoides fueron similares sometiendo las muestras a centrifugaciones de  $1100 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 15 minutos y  $1000 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 11 minutos, no alcanzando en ninguno de los casos una concentración final de al menos  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Así mismo, tampoco se observaron diferencias al modificar solamente el tiempo de centrifugación (Gráfica 2).

Por otro lado, tras el proceso de optimización de la técnica, reduciendo un paso de centrifugación al llevar a cabo el bloqueo a través de los diferentes lavados, sí se consiguió alcanzar el millón de células espermáticas por mililitro al final del protocolo llevado a cabo en placa (Gráfica 3). Este hecho dio lugar a la idea de intentar reducir un paso de centrifugación del protocolo, aunque era necesario comprobar si la detección de la señal era la misma con uno u otro protocolo.



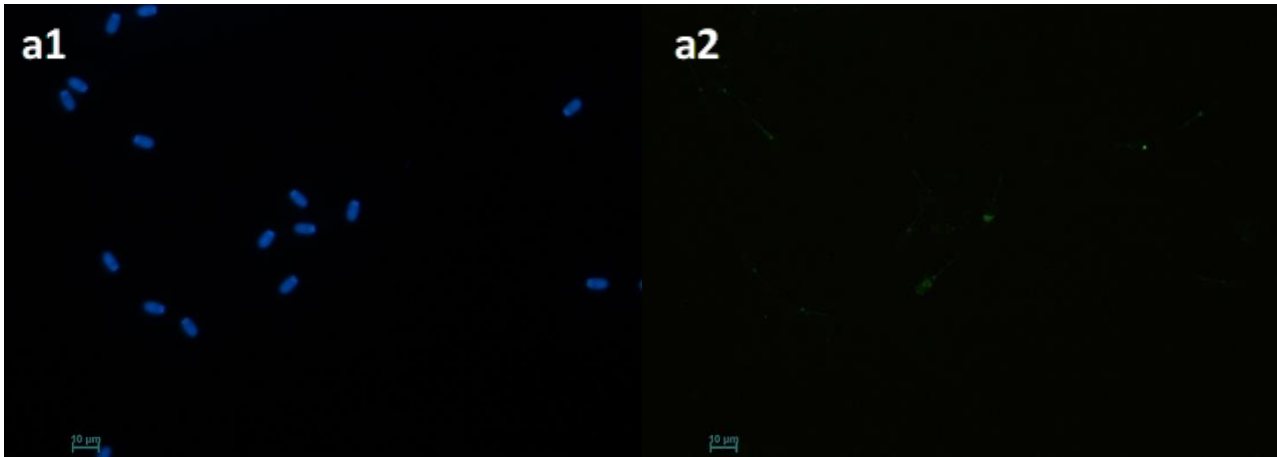
**Gráfico 2:** Representación gráfica de la concentración final de espermatozoides (M/ml) para el protocolo con centrifugaciones a 1000 × g 11 min 4 °C, 1100 × g 20 min 4 °C y 1100 × g 15 min 4 °C.



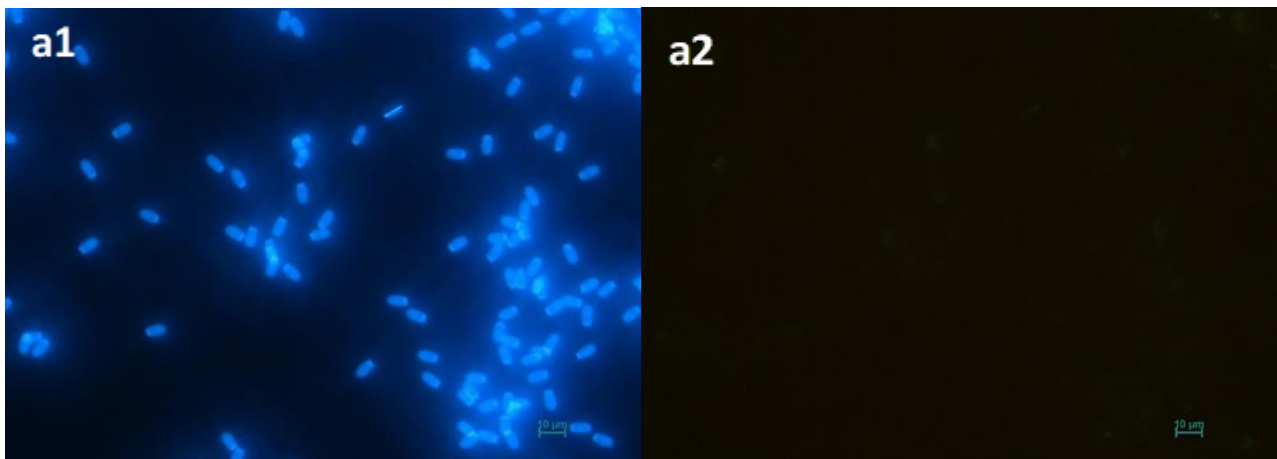
**Gráfico 3:** Representación gráfica de la concentración final de espermatozoides (M/ml) para el protocolo con centrifugaciones a 1100 × g 11 min 4 °C, sin paso específico de bloqueo con BSA.

#### 4.2. RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE 8-OHdG

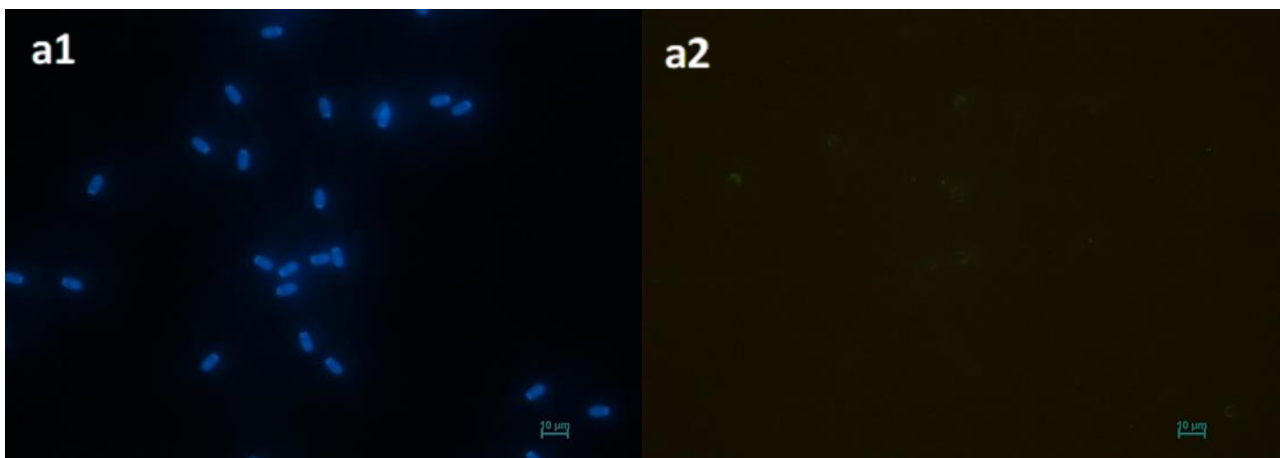
En lo relativo a la inmunodetección de la 8-OHdG a partir de la descongelación de pajuelas de muestras espermáticas porcinas, los mejores resultados mediante la visualización de las muestras en el microscopio de fluorescencia (40×), se obtuvieron con el tratamiento 20 mM DTT de descondensación y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1% de permeabilización (Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9). Sin embargo, cuando se hizo el procesamiento de las muestras en inmunocitoquímica a partir de muestras congeladas en el medio TNE, se observó una mayor intensidad de fluorescencia en todos los tratamientos (Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 13), la cual fue cuantificada posteriormente mediante el programa informático ImageJ.



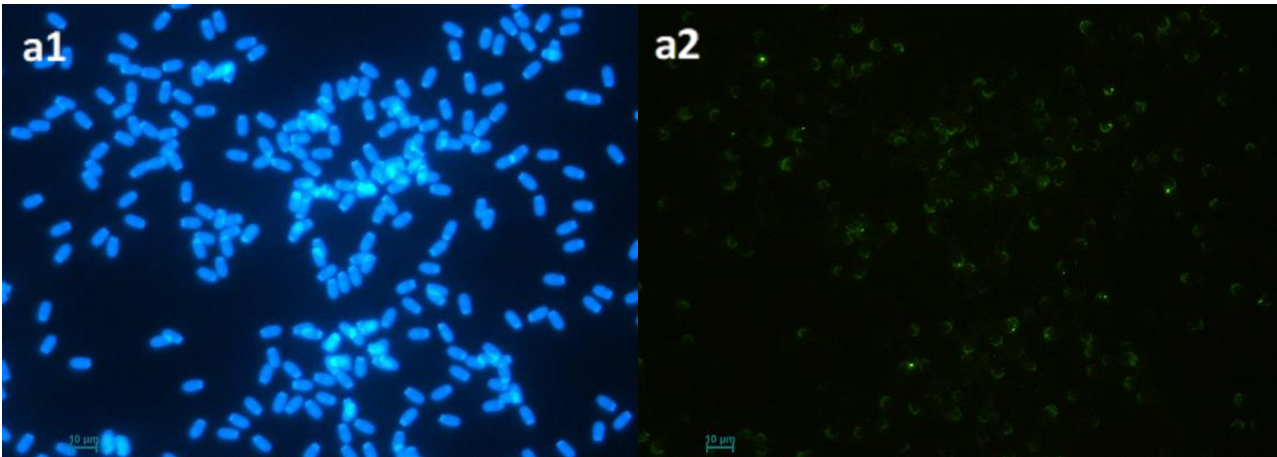
**Figura 6:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en espermatozoides de cerdo mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 25 mM DTT sin permeabilización. **a1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **a2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



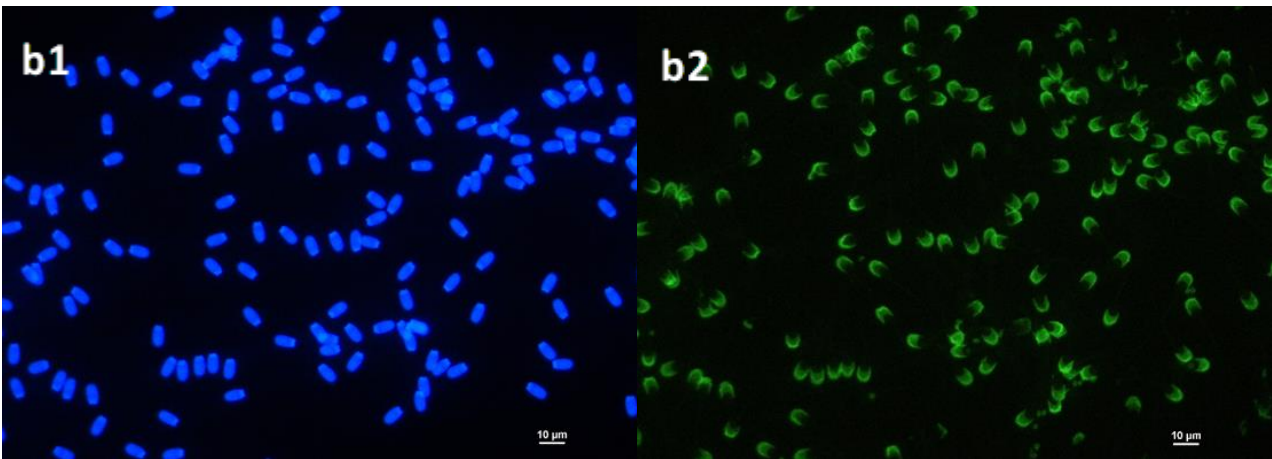
**Figura 7:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en espermatozoides de cerdo mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 10 mM DTT y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%. **a1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **a2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



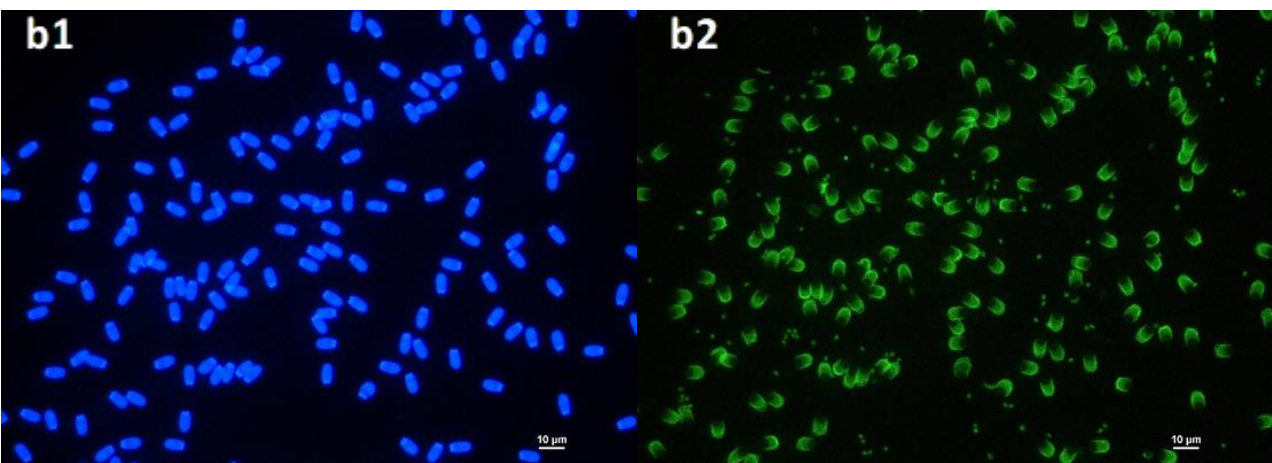
**Figura 8:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en espermatozoides de cerdo mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 10 mM DTT y Citrato sódico 0,5% en Triton 0,5%. **a1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **a2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



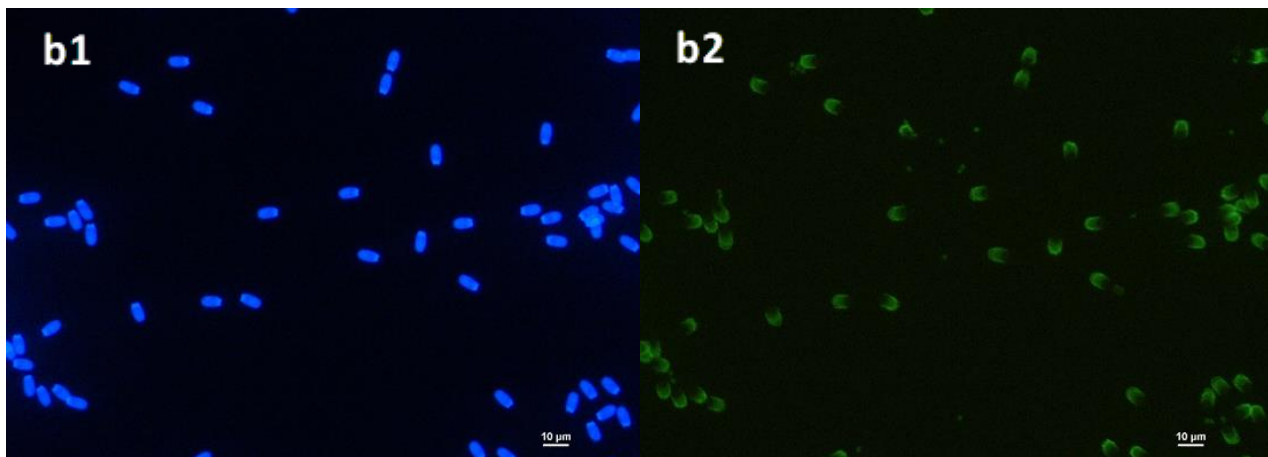
**Figura 9:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en espermatozoides de cerdo mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 20 mM DTT y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%. **a1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **a2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



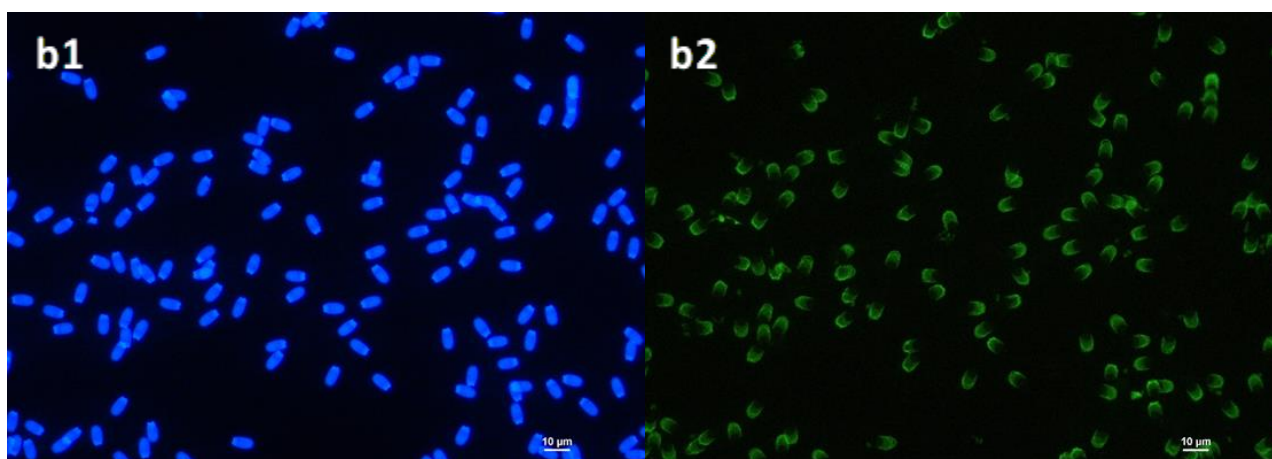
**Figura 10:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en muestras de cerdo congeladas en TNE mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 25 mM DTT sin permeabilización. **b1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **b2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



**Figura 11:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en muestras de cerdo congeladas en TNE mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 10 mM DTT y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%. **b1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **b2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



**Figura 12:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en muestras de cerdo congeladas en TNE mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 10 mM DTT y Citrato sódico 0,5% en Triton 0,5%. **b1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **b2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.



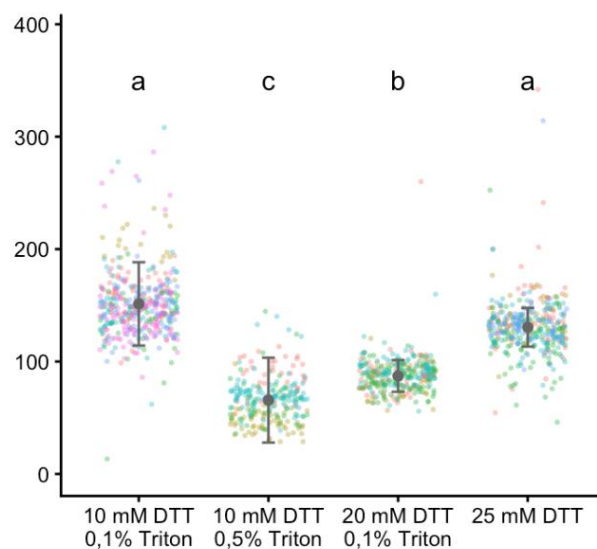
**Figura 13:** Localización celular e intensidad de 8-OHdG en muestras de cerdo congeladas en TNE mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal aplicando el tratamiento de 20 mM DTT y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%. **b1.** ADN teñido con Hoechst (azul) en espermatozoide de cerdo. **b2.** 8-OHdG teñida con anticuerpo directo conjugado con FITC (verde) en espermatozoides de cerdo.

En el caso de los controles negativos utilizados como referencia para poner a punto la técnica de inmunocitoquímica, obtuvimos que el bloqueo de la señal con Trolox no fue muy eficiente, encontrando señal en la mayor parte de los campos tomados en el microscopio de fluorescencia. Sin embargo, al hacer el bloqueo con el biomarcador de la 8-OHdG, tras ser incubado con el anticuerpo, obtuvimos que a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  (proporción 1:1 anticuerpo:péptido) aún se observaba algo de señal, pero a partir de 0,2  $\mu\text{M}$  (proporción 1:2 anticuerpo:péptido) la señal desaparecía (Figura 14 y Figura 15, Anexo II).

En cuanto a los controles positivos, a concentraciones muy elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 M y 1 M) no se encontraba señal (Figura 16 y Figura 17, Anexo II), quizás era demasiado oxidante. Los mejores resultados se encontraron en el rango entre 100 mM y 30 mM (Figura 18 y Figura 19,

Anexo II). A partir de 10 mM (Figura 20, Anexo II) y concentraciones decrecientes, se volvía a perder la señal.

Los tratamientos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre ellos en relación a la variable intensidad de fluorescencia (IntDen). Se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos entre sí ( $p < 0,001$ ), excepto entre los tratamientos 20 mM DTT 0,1% Triton y 10 mM DTT 0,5% Triton ( $p = 0,024$ ) no mostrando apenas diferencias, y entre 10 mM DTT 0,1% Triton y 25 mM DTT. Esto nos indica que el tratamiento que presenta una mayor emisión de fluorescencia es el de 10 mM DTT 0,1% Triton, seguido por 25 mM DTT (Gráfica 4). La descripción del protocolo optimizado se encuentra detallado en el Anexo III (Figura 14).



**Gráfica 4:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia con el anticuerpo directo anti-8-OHdG-FITC en base a los tratamientos ensayados para inmunodetección de la 8-OHdG. Los resultados (unidades de fluorescencia) son expresados como puntos individuales (espermatozoides), barras de error (desviación típica) y puntos en las barras (medias). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSIÓN

El sector porcino juega un papel clave en la economía española. Actualmente, alrededor del 90% de ganado porcino se produce mediante inseminación artificial (Rahman *et al.*, 2017). Por lo tanto, es indispensable una evaluación rigurosa de la fertilidad masculina para que la IA suministre un producto altamente fértil y una genética superior (Diether, 2015). En los últimos años, se han desarrollado biomarcadores genómicos y proteómicos para el diagnóstico de la infertilidad masculina (Kang *et al.*, 2019).

En el presente estudio se ha optimizado la inmunodetección de 8-OHdG en espermatozoides porcinos, basado en la formación de aductos de bases de ADN como marcador

temprano de la oxidación del ADN, para la posterior cuantificación de la oxidación del ADN mediante citometría de flujo.

Al inicio del experimento tuvimos problemas con la recuperación de los espermatozoides, ya que no se alcanzaba una concentración final de al menos  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Esto resulta en una menor cantidad de células analizadas. La explicación a este suceso se debe a la eliminación de un paso de centrifugación al llevar a cabo el bloqueo a través de los diferentes lavados. También puede influir una mala resuspensión tras las centrifugaciones, ya que mejorando la técnica se alcanzaron concentraciones de hasta  $8 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Es conocido que la cromatina de los espermatozoides de los mamíferos se encuentra organizada en una estructura muy estable y compacta, compuesta de ADN y nucleoproteínas heterogéneas (Ihara *et al.*, 2014). Además, durante la espermiogénesis se produce un cambio de histonas por protaminas, dando lugar a una estructura de empaquetamiento del ADN más denso.

Como indicamos anteriormente, el cerdo carece de protamina P2, al igual que el toro, carnero o rata. Según un estudio realizado por Gosálvez *et al.* (2011) las especies que expresan solo P1 presentan una cromatina más compactada. La P2 presenta una deficiencia en residuos de cisteína, por lo que se forman menos puentes de disulfuro y se produce una estructura más inestable en especies que poseen tanto P1 como P2 (Evenson, 2013). De hecho, la P1 en el espermatozoide de cerdo presenta un mayor número de residuos de cisteína (10 residuos) en comparación con otras especies, como burro (8 residuos), toro (7 residuos), carnero (7 residuos) o humano (6 residuos) (Gosálvez *et al.*, 2011).

Esto supuso un problema para la inmunodetección de la 8-OHdG. Para descondensar la cromatina nuclear de los espermatozoides se utilizó el reactivo DTT, agente reductor que relaja la estructura de la cromatina de los espermatozoides de mamíferos al romper específicamente puentes disulfuro entre moléculas de protamina contiguas (Codrington *et al.*, 2007). Soria-Meneses *et al.* (2019) en su ensayo de inmunodetección de 8-OHdG en espermatozoides de carnero descondensaron los espermatozoides con DTT a una concentración de 2 mM. Sin embargo, el carnero presenta una menor proporción de residuos de cisteína que el cerdo, por lo que nosotros tuvimos que incrementar la concentración de la solución de descondensación (10 mM, 20 mM y 25 mM). En base a los resultados obtenidos, el tratamiento que presenta una mayor emisión de fluorescencia es el de 10 mM DTT, seguido por 25 mM DTT y 20 mM DTT.

Para permeabilizar la membrana plasmática de los espermatozoides, contribuir a una descondensación más rápida de la cabeza de los mismos (Zambrano *et al.*, 2016) y mejorar el acceso al núcleo espermático al resto de soluciones utilizadas se empleó el detergente Triton. Se obtuvieron mejores resultados con permeabilización suave (Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%) que con una permeabilización más fuerte (Citrato sódico 0,5% en Triton 0,5%). Sin embargo, el tratamiento con 25 mM DTT sin permeabilización mostró una emisión de fluorescencia mayor que le tratamiento con 20 mM DTT y Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%.

Las imágenes obtenidas muestran una fluorescencia más intensa en la región acrosomal. La explicación de este fenómeno se basa en que las membranas plasmáticas de los espermatozoides contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, susceptibles a la peroxidación lipídica, haciéndolas extremadamente vulnerables al estrés oxidativo. A esto se le añaden las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes en la membrana plasmática espermática (catalasas, glutatión reductasa, peroxidasas), por lo que se vuelven todavía más sensibles al ataque por ROS, sobre todo en la región acrosomal (Izquierdo *et al.*, 2020). Pintus *et al.* (2018) en su estudio confirmaron un aumento de los niveles de peroxidación lipídica y un declive de la motilidad de espermatozoides de verraco inducido por un estado de estrés oxidativo. La generación de ROS dañó la membrana plasmática de la cabeza del esperma y la integridad del acrosoma.

## 6. CONCLUSIONES

1. En relación al experimento de recuperación de espermatozoides se comprobó que, eliminando el paso específico de bloqueo, se reducía la pérdida de células. Además, es fundamental resuspender bien en cada paso tras cada centrifugación.
2. En este estudio se ha logrado diseñar un protocolo para evaluar los niveles de oxidación del ADN de espermatozoides porcinos mediante inmunodetección de 8-OHdG. Atendiendo a los resultados obtenidos, el tratamiento óptimo en espermatozoides porcinos es el de descondensación con 10 mM DTT y permeabilización con Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1%, seguido de los tratamientos procesados con 25 mM DTT y 20 mM DTT + 0,1% Citrato sódico en 0,1% Triton.
3. El tratamiento que obtuvo una menor intensidad de fluorescencia fue el procesado con 10 mM DTT + 0,5% Citrato sódico en 0,5% Triton. Estos resultados sugieren que una mayor permeabilización podía estar anulando a la señal de la 8-OHdG.



4. Las muestras espermáticas presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en la región acrosomal, por lo que en esa área podría haber cromatina más sensible al estrés oxidativo.

## 7. REFERENCIAS

- Agarwal, A. y Deepinder, F. (2009) "Determination of seminal oxidants (reactive oxygen species)", en Howards, S., Lipshultz, L y Niederberger, C. (eds.) *Infertility in the Male*. 4.<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 618-632.
- Aitken, R. J. (2017) "DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring", *Translational andrology and urology*, 6(4), pp. S761-S764.
- Aitken, R. J., Smith, T. B., Jobling, M. S., Baker, M. A. y De Iulius, G. N. (2014) "Oxidative stress and male reproductive health", *Asian journal of andrology*, 16(1), pp. 31-38.
- Alberts, B., Dennis, B., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2011) *Introducción a la biología celular*. 3.<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Ausejo, R., Martínez, J. M., Soler-Llorens, P., Bolarín, A., Tejedor, T. y Falceto, M. V. (2021) "Seasonal Changes of Nuclear DNA Fragmentation in Boar Spermatozoa in Spain", *Animals*, 11(2), pp. 1-13.
- Balawender, K. y Orkisz, S. (2020) "The impact of selected modifiable lifestyle factors on male fertility in the modern world", *Central European Journal of Urology*, 73(4), pp. 563-568.
- Bansal, A. K. y Bilaspuri, G. S. (2011) "Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions", *Veterinary medicine international*, 2011, pp. 1-7.
- Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., ALSalamat, H. A. y Bashatwah, R. M. (2018) "Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body", *The Eurasian journal of medicine*, 50(3), pp. 193-201.
- 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.
- Benito Jiménez, C. y Espino Nuño, F. J. (2013) *Genética: conceptos esenciales*. 1.<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Cambi, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Olivito, B., Azzari, C., Forti, G., Baldi, E. y Muratori, M. (2013) "Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects", *Reproduction*, 145(3), pp. 227-235.
- Casado Cerdeño, M. E. (2012) *Papel de la lipasa sensible a hormonas en el testículo de ratón. Implicación de los lípidos y los receptores "scavenger" clase B en fertilidad*. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá.
- Castillo Paterna, M. D. M. (2002) *Modelos de envejecimiento in vitro e in vivo, estrés oxidativo y protección antioxidante*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante.
- Chicano, J. A. (2015) *Estructura de la cromatina a lo largo del ciclo celular. Aplicación de la crio-tomografía electrónica al estudio de la estructura de las placas de cromatina metafásica*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

- Codrington, A. M., Hales, B. F. y Robaire, B. (2007) "Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa", *Human Reproduction*, 22(5), pp. 1431-1442.
- Contreras, G. O., Mier, G. M., Zúñiga, A. y Ceccatelli, A. P. (2004) "Antioxidantes y aterosclerosis", *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 12(4), pp. 199-206.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., López-Fernández, C., Fernández, J. L. y Gosálvez, J. (2007) "Evaluación del daño en el DNA espermático", *Actas urológicas españolas*, 31(2), pp. 120-131.
- Diether, N. E. (2015) *Biological Markers of Boar Fertility*. Tesis Doctoral. University of Alberta.
- Donkin, I. y Barrès, R. (2018) "Sperm epigenetics and influence of environmental factors", *Molecular metabolism*, 14, 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(1), pp. 1-11.
- Evenson, D. P. (2013) "Sperm chromatin structure assay (SCSA®)", en Carrell, D. y Aston, K. (eds.) *Spermatogenesis*. 1.<sup>a</sup> ed. Totowa: Humana Press, pp. 147-164.
- 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, pp. 56-75.
- Evenson, D. y Jost, L. (1994) "Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability", en Darzynkiewicz, Z., Robinson, P.J. y Crissman, H. A. (eds.) *Methods in cell biology*. 2.<sup>a</sup> ed. London: Academic Press, pp. 159-176.
- Gadea, J. (2019) "Desarrollo de un estándar de calidad para centros de inseminación porcina en España: la propuesta ANPSTAND", *Suis*, (154), pp. 16-20.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. y Ben-Sasson, S. A. (1992) "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation", *Journal of cell Biology*, 119(3), pp. 493-501.
- Gharagozloo, P. y Aitken, R. J. (2011) "The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy", *Human reproduction*, 26(7), pp. 1628-1640.
- Gharagozloo, P., Gutiérrez-Adán, A., Champroux, A., Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., Pérez-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.
- Giraldo Giraldo, J. J. (2019) "Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos", *Revista Lasallista de investigación*, 16(1), pp. 244-252.
- 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.
- 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.
- Gunes, S., Al-Sadaan, M. y Agarwal, A. (2015) "Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility", *Reproductive biomedicine online*, 31(3), pp. 309-319.
- Hoeijmakers, J. H. (2009) "DNA damage, aging, and cancer", *New England Journal of Medicine*, 361(15), pp. 1475-1485.
- Ihara, M., Meyer-Ficca, M. L., Leu, N. A., Rao, S., Li, F., Gregory, B. D., Zalenskaya, I. A., Schultz, R. M. y Meyer, R. G. (2014) "Paternal poly (ADP-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression", *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1004317.

INTERPORC (2020) *Envergadura del Sector Porcino*. Madrid.

Izquierdo, A. C., Iglesias, A. E., Guerra, J. E., Huerta, R. y Sánchez, R. (2020) “El estrés oxidativo en la fertilidad y desempeño reproductivo de mamíferos hembras y machos”, *Revista Veterinaria*, 31(1), pp. 97-100.

Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C. A. C., Jiménez, M. S. C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R. y Salinas, K. A. (2009) “Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática/oxidative stress and antioxidants in the spermatocidal conservation”, *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), pp. 1.

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, pp. 31-38.

Kumaresan, A., Gupta, M. D., Datta, T. K., y Morrell, J. M. (2020) “Sperm DNA integrity and male fertility in farm animals: A review”, *Frontiers in Veterinary Science*, 7, pp. 1-15.

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*, 50(3), pp. 1-10.

Le Blévec, E., Muroňová, J., Ray, P. y Arnoult, C. (2020) “Paternal epigenetics: Mammalian sperm provide much more than DNA at fertilization”, *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:10.1016/j.mce.2020.110964.

Le, M. T., Nguyen, D. N., Le, D. D. y Tran, N. Q. T. (2020) “Impact of body mass index and metabolic syndrome on sperm DNA fragmentation in males from infertile couples: A cross-sectional study from Vietnam”, *Metabolism open*. doi:10.1016/j.metop.2020.100054.

Liu, Q., Duan, R. J., Zhou, Y. F., Wei, H. K., Peng, J. y Li, J. L. (2017) “Supplementing oregano essential oil to boar diet with strengthened fish oil: Effects on semen antioxidant status and semen quality parameters”, *Andrologia*. doi:10.1111/and.12764.

Lorences, M. E. (2009) *La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Matorras, R., Hernández, J. y Molero, D. (2008) *Tratado de reproducción humana para enfermería*. 1ª. ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

May, S. (2018) *The effect of different engineered nanomaterials (ENMs) on DNA damage and repair pathways*. Tesis Doctoral. University of Konstanz.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020) *El sector de la carne de cerdo en cifras*. Madrid.

Mol, C. D., Izumi, T., Mitra, S. y Tainer, J. A. (2000) “DNA-bound structures and mutants reveal a basic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination”, *Nature*, 403(6768), pp. 451-456.

Ni, W., Huang, Y., Wang, X., Zhang, J. y Wu, K. (2014) “Associations of neonatal lead, cadmium, chromium and nickel co-exposure with DNA oxidative damage in an electronic waste recycling town”, *Science of the total environment*, 472, pp. 354-362.

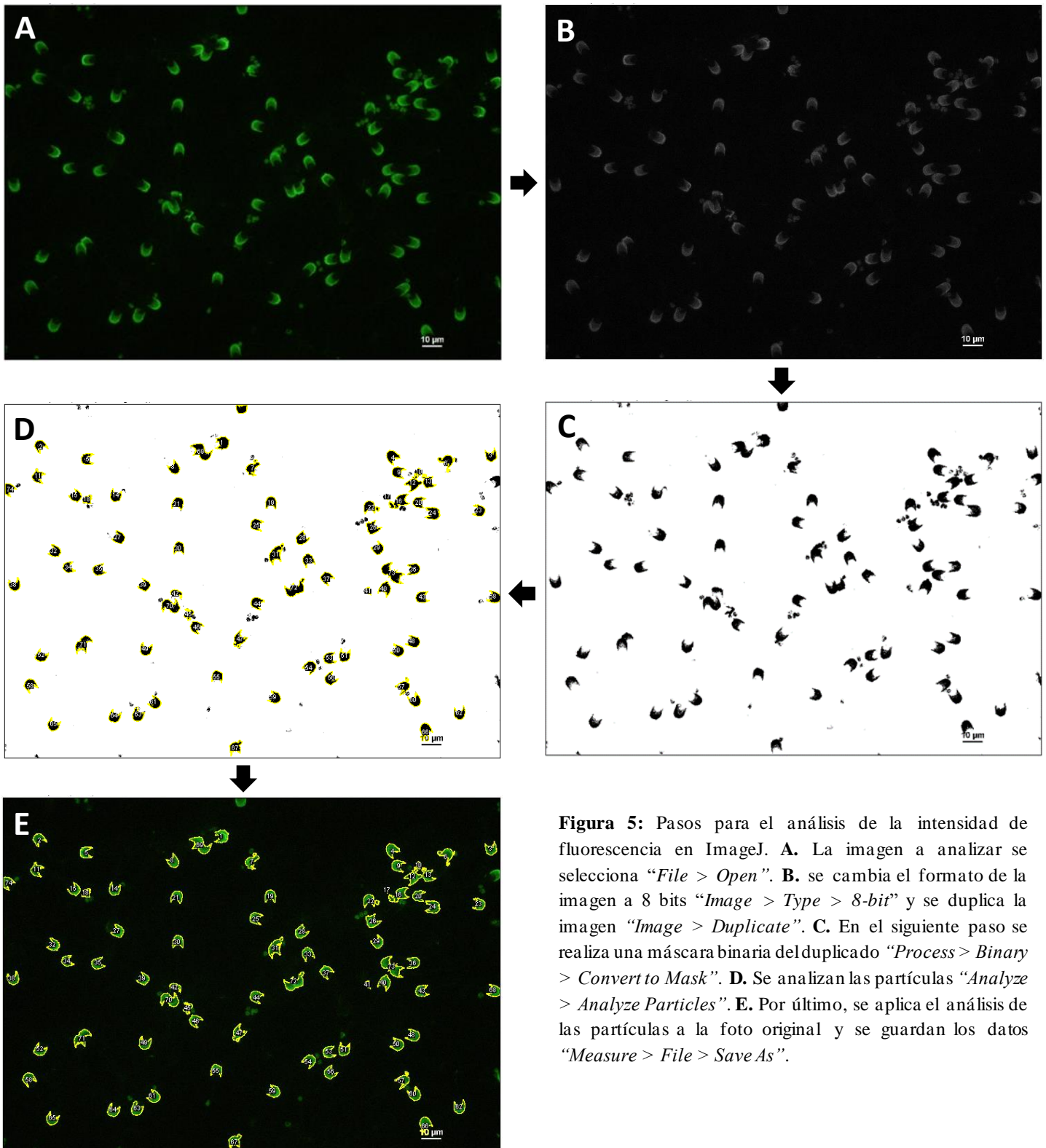
Nicolich, A., Lafuente, R., López, G., Peiró, A. G. y Brassesco, M. (2013) “Análisis del estrés oxidativo en el eyaculado mediante la determinación del anión superóxido”, *ASEBIR*, 18(1), pp. 15-19.

Ordás, L., Mata-Campuzano, M., Álvarez, M., Anel, L., de Paz, P. y Martínez-Pastor, F. (febrero, 2013) *Antioxidants Trolox and GSH modify the motility subpopulation pattern of ram semen*. Presentado en International Sheep Veterinary Congress. Rotorua, New Zealand.

Ostling, O. y Johanson, K. J. (1984) “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), pp. 291-298.

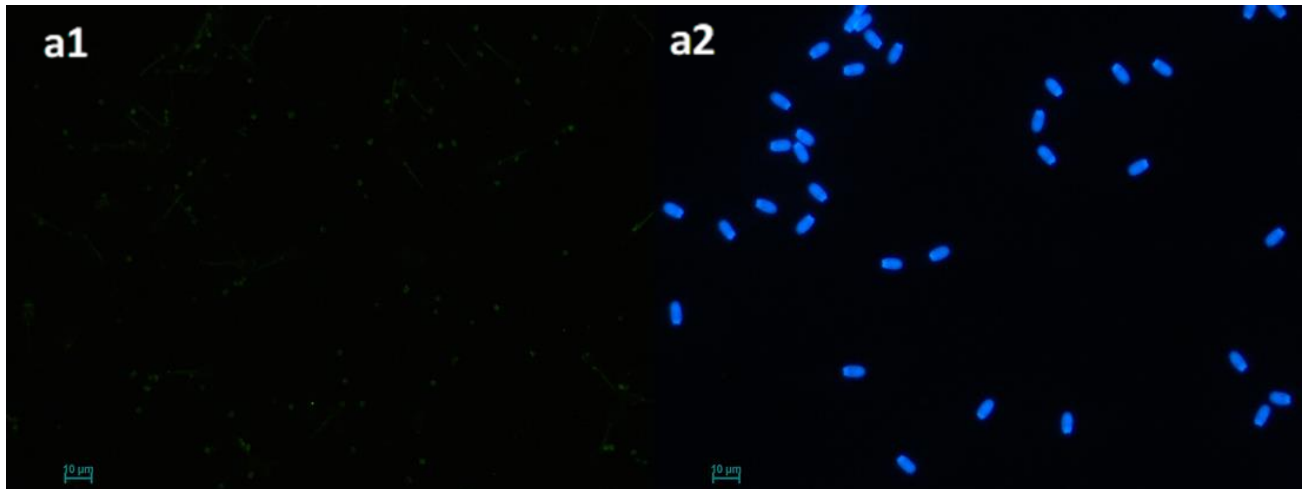
- Peiró, A. G. (2012) *Caracterización múltiple de la fragmentación del ADN espermático en pacientes infértiles*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Pierce, B. A. (2016) *Genética: un enfoque conceptual*. 5ª. ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Pintus, E., Kadlec, M., Jovičić, M., Sedmíková, M. y Ros-Santaella, J. L. (2018) “Aminoguanidine protects boar spermatozoa against the deleterious effects of oxidative stress”, *Pharmaceutics*, 10(4), pp. 212.
- 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.
- Roca, J., Parrilla, I., Bolarin, A., Martínez, E. A. y Rodríguez-Martínez, H. (2016) “Will AI in pigs become more efficient?”, *Theriogenology*, 86(1), pp. 187-193.
- Rodríguez, A. G. (2018) *Estudio de nuevos marcadores de infertilidad masculina*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Saacke, R. G., Dalton, J. C., Nadir, S., Nebel, R. L. y Bame, J. H. (2000) “Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality”, *Animal reproduction science*, 60, pp. 663-677.
- 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, pp. 34-39.
- Shen, H. M. y Liu, Z. G. (2006) “JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species”, *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), pp. 928-939.
- Soria-Meneses, P. J., Jurado-Campos, A., Montoro, V., Soler, A. J., Garde, J. J. y Fernández-Santos, M. D. R. (2019) “Ovine sperm DNA oxidation quantification using an 8-OHdG immunodetection assay”, *Reproduction in Domestic Animals*, 54, pp. 59-64.
- Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S., Yongvanit, P., Kawanishi, S. y Murata, M. (2015) “Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer”, *International journal of molecular sciences*, 16(1), pp. 193-217.
- Universidad de Oviedo (sin fecha) *Programa: Confocal Uniovi ImageJ*. Disponible en: <http://spi03.sct.uniovi.es/confocaluniovi/confocaluniovi.htm> (Accedido: 3 de mayo de 2021).
- 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.
- Vicenta Paparella, C., Pavesi, A. B., Feldman, R. N. y Bouvet, B. R. (2015) “Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano”, *Archivos de medicina interna*, 37(1), pp. 7-14.
- Vicente, L. S. (2014) *Desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas para la manipulación de la quimiorresistencia y como biosensores de agentes genotóxicos*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Vorilhon, S., Brugnol, F., Kocer, A., Dollet, S., Bourgne, C., Berger, M., Janny, L., Pereira, B., Aitken, R. J., Moazamian, A., Ghara gozloo, 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 (2021) *Health topics. Infertility*. Disponible en: [https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1) (Accedido: 17 de febrero de 2021).
- Zambrano, F., Aguila, L., Arias, M. E., Sánchez, R. y Felmer, R. (2016) “Improved preimplantation development of bovine ICSI embryos generated with spermatozoa pretreated with membrane-destabilizing agents lyssolecithin and Triton X-100”, *Theriogenology*, 86(6), pp. 1489-1497.

## ANEXO I: PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE IMÁGENES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN IMAGEJ

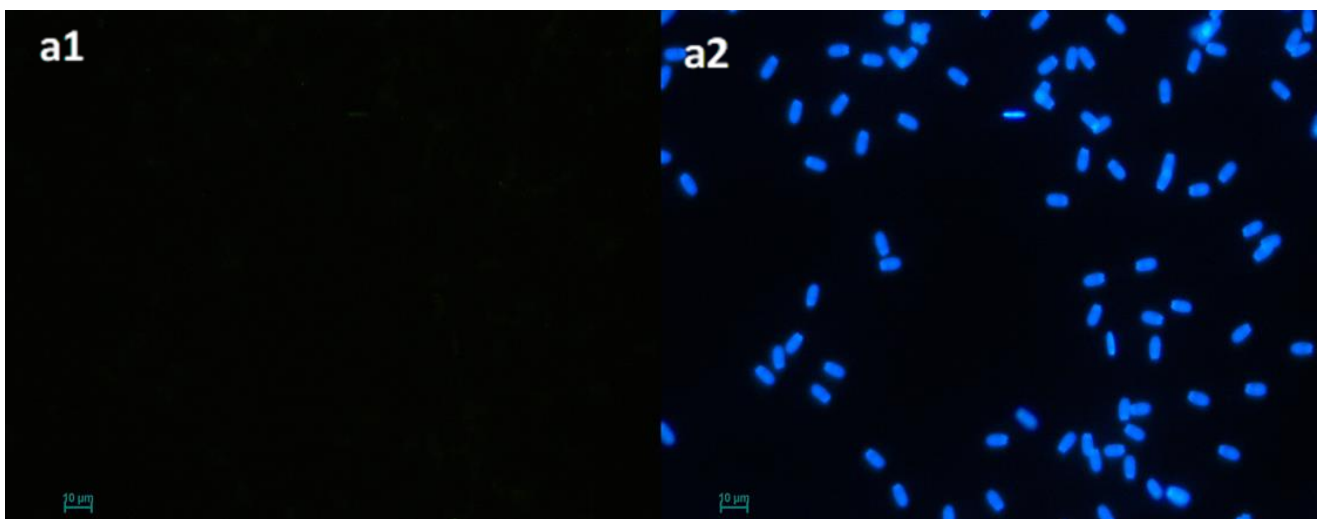


**Figura 5:** Pasos para el análisis de la intensidad de fluorescencia en ImageJ. **A.** La imagen a analizar se selecciona “*File > Open*”. **B.** se cambia el formato de la imagen a 8 bits “*Image > Type > 8-bit*” y se duplica la imagen “*Image > Duplicate*”. **C.** En el siguiente paso se realiza una máscara binaria del duplicado “*Process > Binary > Convert to Mask*”. **D.** Se analizan las partículas “*Analyze > Analyze Particles*”. **E.** Por último, se aplica el análisis de las partículas a la foto original y se guardan los datos “*Measure > File > Save As*”.

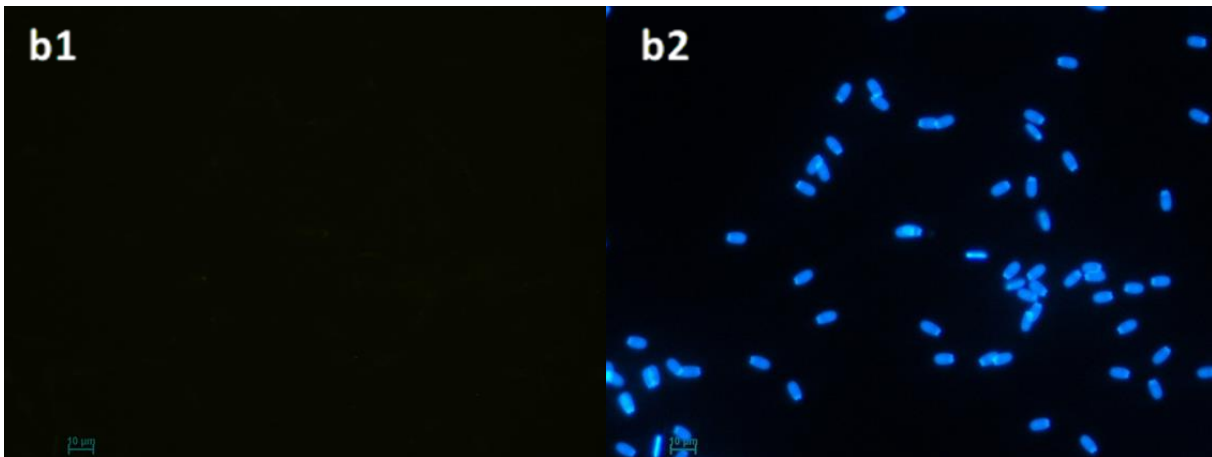
## ANEXO II: CONTROLES NEGATIVOS Y POSITIVOS DE INMUNODETECCIÓN DE LA 8-OHdG



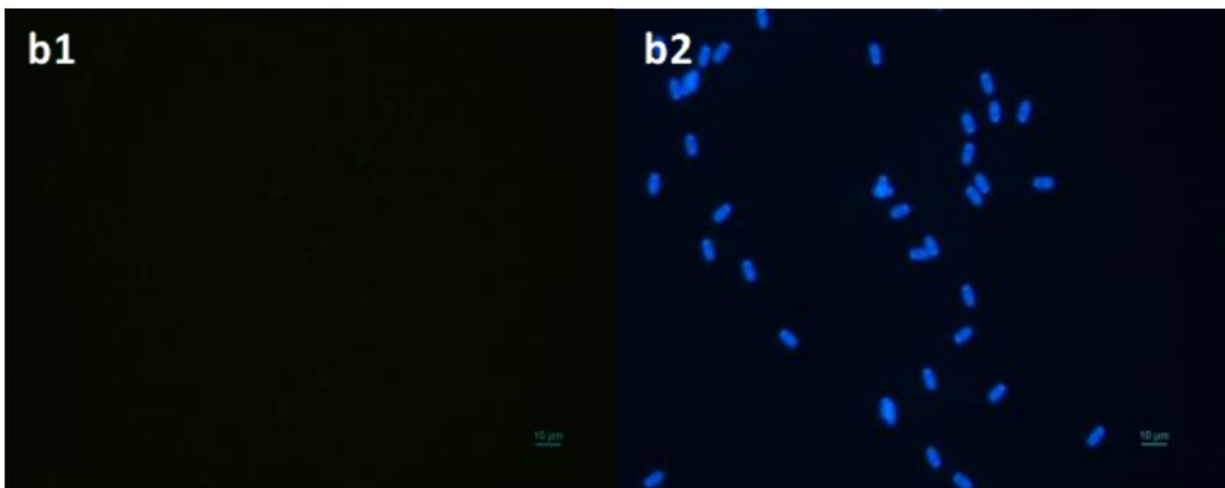
**Figura 14:** **a1.** Imagen del control negativo 0,1  $\mu\text{M}$  del biomarcador 8-OHdG utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **a2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



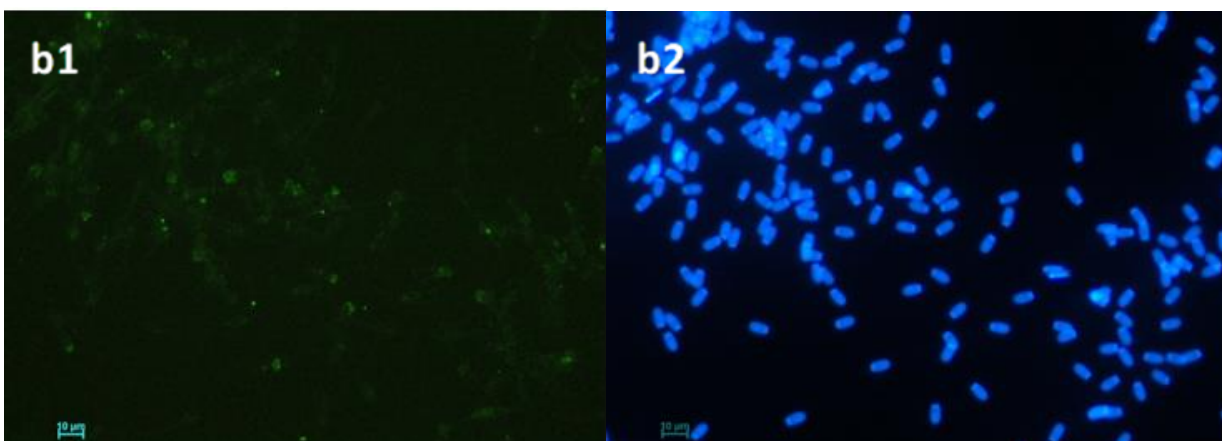
**Figura 15:** **a1.** Imagen del control negativo 0,2  $\mu\text{M}$  del biomarcador 8-OHdG utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **a2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



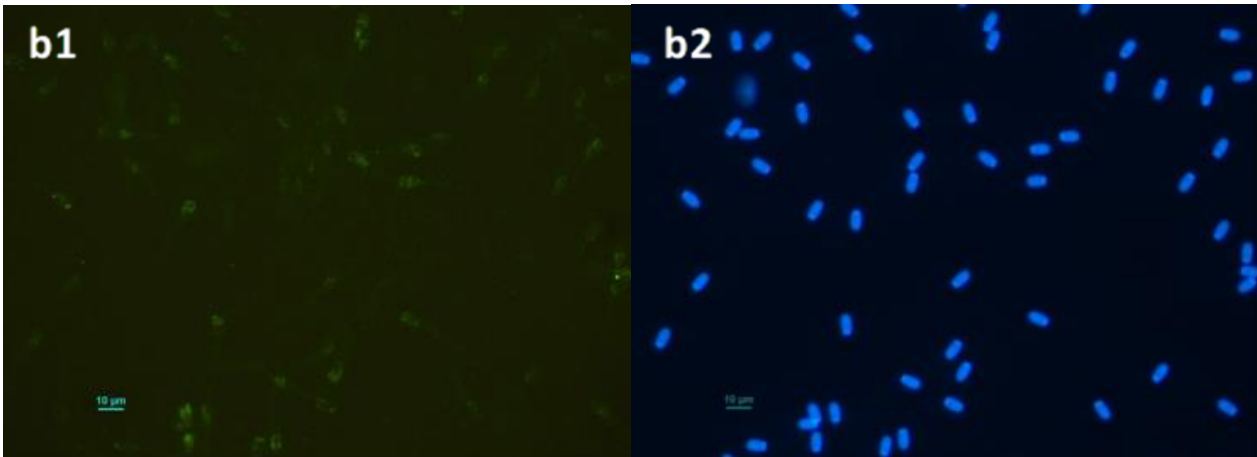
**Figura 16: b1.** Imagen del control positivo 5 M de  $H_2O_2$  utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **b2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



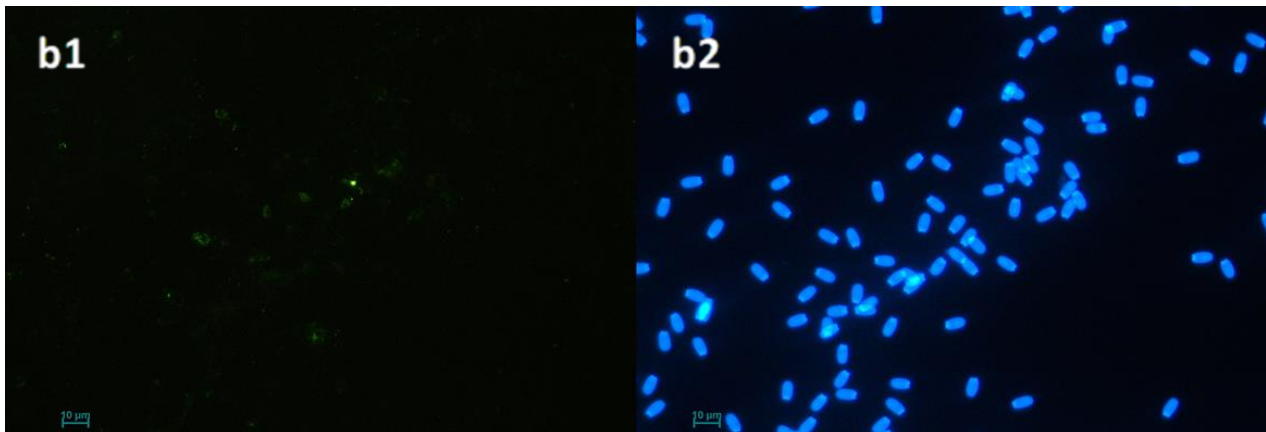
**Figura 17: b1.** Imagen del control positivo 1 M de  $H_2O_2$  utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **b2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



**Figura 18: b1.** Imagen del control positivo 100 mM de  $H_2O_2$  utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **b2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



**Figura 19: b1.** Imagen del control positivo 30 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **b2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



**Figura 20: b1.** Imagen del control positivo 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el objetivo 40X del microscopio de fluorescencia **b2.** teniendo como referencia la localización de todas las células espermáticas marcadas mediante Hoechst 33242.



### **ANEXOIII: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE INMUNODETECCIÓN DE LA 8-OHdG EN BASE A LOS RESULTADOS DE ESTE TFG**

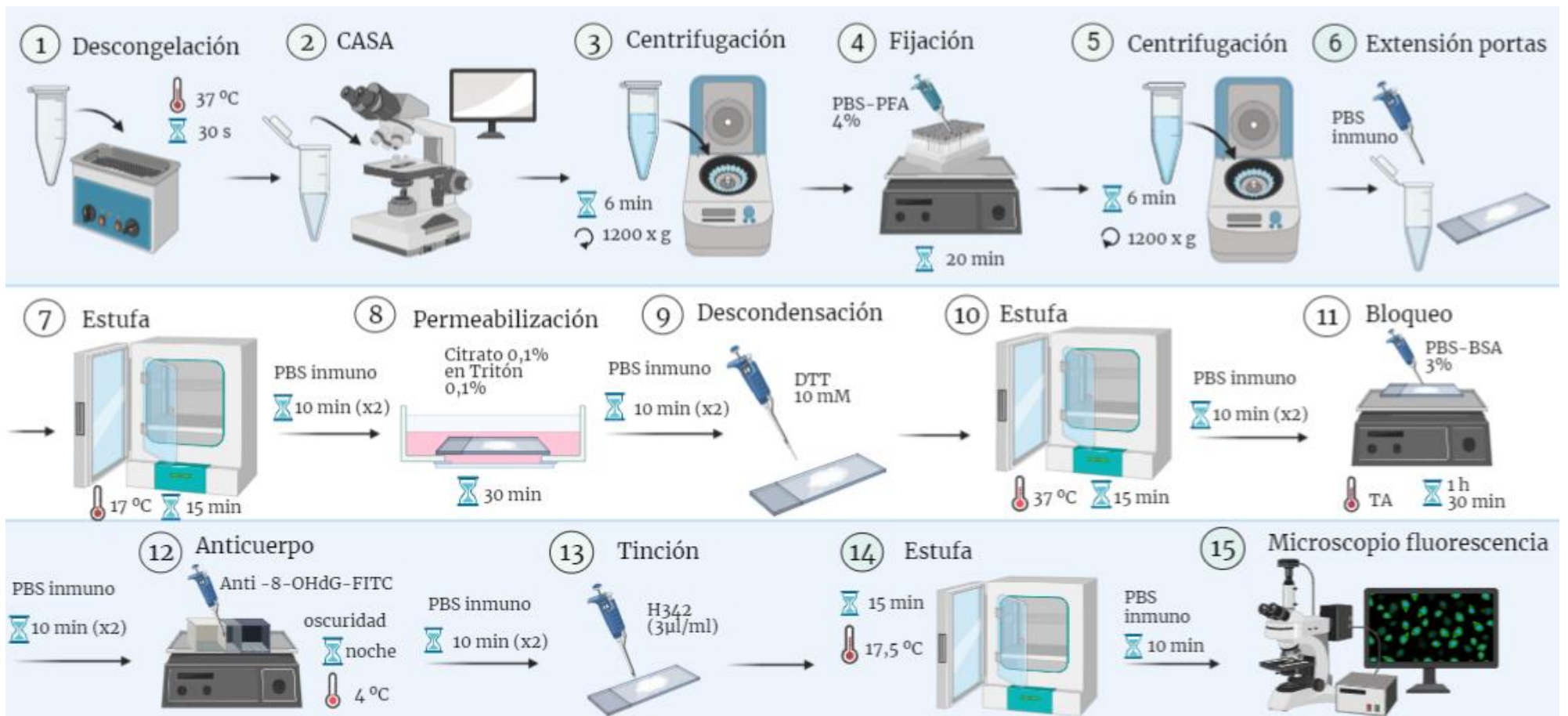
Para la puesta a punto del protocolo de inmunodetección de la 8-OHdG en espermatozoides de cerdo en porta se seleccionaron las combinaciones con mejores resultados tras su análisis mediante el programa estadístico R. Se utilizaron muestras de porcino congeladas en TNE.

En primer lugar, las muestras de semen se descongelaron (37 °C, 30 segundos), partiendo de unos  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Las muestras se centrifugaron a  $1200 \times g$  a TA durante 6 minutos. A continuación, las muestras se fijaron con PBS-PFA 4% a TA durante 20 minutos en movimiento (balancín/rueda). Se centrifugan a  $1200 \times g$  a TA durante 6 minutos y resuspenden en PBS inmuno.

Luego, se colocó cada muestra en su porta correspondiente (20  $\mu$ l muestra) y se secaron en una estufa a 17 °C durante 15 minutos. A continuación, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS inmuno. Se permeabilizaron las muestras añadiendo Citrato sódico 0,1% en Triton 0,1% durante 30 minutos. Se realizaron otros dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS inmuno. Después, se incubaron las muestras con 1 ml de solución de descondensación (DTT 10 mM; dilución 1/100 en agua Milli-Q) a 37 °C durante 15 minutos. Se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS inmuno. Posteriormente, se bloqueó con PBS-BSA al 3% durante 1 hora y 30 minutos en agitación. Se hicieron otros dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS inmuno.

A continuación, se añadió el anticuerpo anti-8-OHdG-FITC (dilución 1/150 en PBS-BSA 1%) y se dejó durante toda la noche en cámara húmeda y movimiento a 4 °C y en oscuridad. La mañana siguiente se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno con PBS inmuno y se añadieron 200  $\mu$ l de solución de tinción (H342 a 3  $\mu$ l/ml en PBS inmuno). Por último, se secaron las gotas en la estufa a 17,5 °C durante 15 minutos y se lavaron las muestras en PBS inmuno durante 10 minutos. Se secaron las muestras, aplicó una gota de ProLong™ Gold Antifade (para evitar la pérdida de la señal fluorescente) y se colocaron los cubreobjetos.

Al día siguiente se sellaron los cuatro lados del cubreobjetos con esmalte de uñas transparente. Una vez que se seca el esmalte de uñas (10-15 minutos, TA), las muestras se analizan con un microscopio de fluorescencia con aumentos de 40 $\times$ .



**Figura 14:** Pasos del protocolo optimizado para la inmunodetección de 8-OHdG.