



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EVALUACIÓN DEL ESTADO DE
COMPACTACIÓN DE LA CROMATINA
ESPERMÁTICA Y LA OXIDACIÓN DE LAS BASES
NITROGENADAS EN UN MODELO PORCINO
EVALUATION OF THE COMPACTION STATUS OF
SPERMATIC CHROMATIN AND OXIDATION OF
NITROGENATED BASES IN A SWINE MODEL**

Autor: Marcos Rojo Martín

Tutores: D. Felipe Martínez Pastor y Dña. Cristina
Soriano Úbeda

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2023

Índice

1. Introducción	1
1.1. Importancia de la industria porcina	1
1.2. Inseminación artificial en la especie porcina.....	2
1.3. Fertilidad del verraco.....	2
1.4. Estructura de la cromatina espermática	3
1.5. Fragmentación del ADN espermático	5
1.6. Oxidación de la cromatina espermática.....	6
1.7. Técnicas de análisis de la cromatina espermática	7
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1. Diseño experimental.....	9
3.2. Reactivos, soluciones y medios	10
3.3. Obtención de las muestras biológicas.....	11
3.4. Preparación y congelación de las muestras biológicas.....	11
3.3. Determinación de los grupos sulfhidrilo libres en espermatozoides	11
3.5. Determinación de la oxidación de las bases nitrogenadas.....	12
3.6. Análisis por citometría de flujo	13
3.7. Análisis estadístico	14
4. Resultados.....	14
4.1. Reducción de puentes disulfuro de la cromatina espermática con el almacenamiento de las dosis.....	14
4.2. Oxidación del ADN espermático con el almacenamiento de las dosis	16
4.3. Correlación entre variables	16
5. Discusión.....	17
6. Conclusiones.....	22
7. Referencias.....	23

Resumen

El impacto económico del mantenimiento de machos reproductores sirve de impulso para la investigación de técnicas de análisis espermático para su identificación temprana. Con este objetivo, proponemos la evaluación de parámetros espermáticos con valor predictivo de la fertilidad, desapercibidos en los análisis de semen rutinarios de los centros de inseminación. Se evaluó el estado de reducción de los puentes disulfuro del ADN mediante el fluorocromo monobromobimano (mBBr), y la oxidación de las bases nitrogenadas, mediante la detección de la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG) por citometría de flujo. Se analizaron muestras de dosis de inseminación artificial en fresco (D0) de 11 machos de fertilidad probada y tras el almacenamiento durante 11 días a 17 °C (D11), como indicadores de daño espermático. Además, las muestras se analizaron en dos épocas distintas del año, en enero y junio de 2022. Los resultados mostraron una mayor proporción de puentes disulfuro reducidos en la cromatina significativamente superior en D11 y, un incremento significativo de la oxidación de la cromatina en el mes de junio, posiblemente relacionado con la estacionalidad. Se propone la aplicación de estas técnicas para el descarte de machos subfértiles y la selección del rango de edad en el que son óptimos reproductores.

Palabras clave: cerdo, cromatina espermática, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, inseminación artificial monobromobimano.

Abstract

The economic impact of the maintenance of breeding males serves as an impetus for the investigation of sperm analysis techniques for their early identification. With this objective, we propose the evaluation of sperm parameters with predictive value for fertility undetected in routine semen analysis in insemination centers. The reduction state of DNA disulfide bridges was evaluated using the fluorochrome monobromobimane (mBBr), and the oxidation of nitrogenous bases, by detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) by flow cytometry. Artificial insemination dose samples were analyzed fresh (D0) from 11 males of proven fertility and after storage for 11 days at 17 °C (D11), as indicators of sperm damage. In addition, samples were analyzed at two different times of the year, in January and June 2022. The results showed a significantly higher proportion of reduced disulfide bridges in chromatin on D11 and a significant increase in chromatin oxidation in June, possibly related to seasonality. The application of these techniques is proposed for the discard of subfertile males and the selection of the age range in which they are optimal breeders.

Key words: artificial insemination, boar, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, monobromobimane, sperm chromatin.

Abreviaturas

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

CASA: *Computer-Assisted Sperm Analysis.*

D0: día 0.

D11: día 11.

DB: *disulfide bonds.*

IA: inseminación artificial.

mBBr: monobromobimano.

MFI: *Mean Fluorescence Intensity.*

MFI-8OHdG: *Mean Fluorescence Intensity* de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

MFI-mBBr: *Mean Fluorescence Intensity* de monobromobimano.

PRM1: protamina 1.

PRM2: protamine 2.

ROS: *Reactive Oxygen Species.*

SCSA: *Sperm Chromatin Structure Assay.*

1. Introducción

1.1. Importancia de la industria porcina

A nivel mundial, se estima que la carne de cerdo es la segunda más consumida, sólo por detrás de la carne de vacuno. Además, las previsiones de crecimiento de la población indican que el consumo de carne de cerdo aumentará un 17% en el periodo de 2021 a 2029 (Racewicz *et al.*, 2021).

En España, el sector porcino constituye un importante motor económico, ya que supone el 14% de la Producción Final Agraria y el 39% de la Producción Final Ganadera, (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, sin fecha). La industria cárnica representa el 2,57% del PIB total español, del que la producción porcina se sitúa como la primera actividad cárnica española, generando el 66,4 % de las carnes producidas en nuestro país. No obstante, la carne de porcino frenó su producción durante 2022 y cayó un 2,2% como consecuencia de la pandemia COVID-19. A pesar de este retroceso, en 2021 logró desbancar a Alemania como primer productor de carne de cerdo en la Unión Europea, convirtiéndose en la tercera potencia mundial, solo por detrás de China y Estados Unidos (ANICE, 2021).

Además, representa una fuente de beneficios sociales ligados a su importancia económica, ya que la industria de la carne de cerdo es un sector clave en la lucha contra la despoblación (INTERPORC, 2021a) y el Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Economía Española para reparar los daños de la crisis del COVID-19 (INTERPORC, 2021b).

El mantenimiento del crecimiento del sector está ligado a la implementación de los avances en materia sanitaria de las explotaciones, en la aplicación de nuevas tecnologías productivas al servicio de las granjas y al control de proceso reproductivo. El control y organización de las gestaciones y partos de las hembras, la nutrición y la optimización del manejo de los reproductores en las granjas es esencial para la rentabilidad de las granjas. La mejora de este sector en las últimas décadas se debe en gran medida a los avances en biotecnología reproductiva, siendo la inseminación artificial (IA) la técnica de referencia para la producción en esta especie. En la actualidad, la IA se aplica en el 90% de las granjas de los países industrializados. La optimización de la IA está ligada al análisis de la calidad del semen. El aumento de la eficiencia en el uso de semen de verracos de alto valor genético acontecido en los últimos años ha sido posible gracias a la implementación de técnicas de análisis de semen de última generación (Riesenbeck, 2011; Waberski *et al.*, 2019).

Los avances en biotecnologías reproductivas han tenido profundos efectos sobre la estructura, producción, eficiencia calidad y rentabilidad de la industria; y la adopción de estos sistemas ha contribuido a generar un suministro sostenible de carne de cerdo asequible y segura (Knox, 2014).

1.2. Inseminación artificial en la especie porcina

La IA es un procedimiento consistente en el depósito de una suspensión de espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra con el objetivo de superar los problemas logísticos asociados al apareamiento natural (Agca, 2020) y aumentar la rentabilidad de la granja.

Los orígenes de la IA en cerdo se remontan a los experimentos de Ivanow (1907), a principios del siglo XX. Diversos ensayos de esta técnica se sucedieron a lo largo de la primera mitad de siglo sin llegar a obtener datos de fertilidad y prolificidad superiores a los de la monta natural.

A partir de 1980, se ha posicionado como uno de los pilares de la producción intensiva de cerdo. El empleo de las técnicas de IA a nivel comercial ha sido posible, principalmente, debido al desarrollo de mejores diluyentes y la estandarización de las técnicas de IA (Rodríguez-Gil y Estrada, 2013). El progreso en el desarrollo de los diluyentes de espermatozoides permitió mejorar la preservación del semen en refrigeración, la utilización en diferido de las dosis de IA, la rentabilidad de la granja por la obtención de múltiples dosis de IA a partir de un solo eyaculado y el transporte de las dosis desde los centros de verracos a las granjas (Pezo *et al.*, 2019).

1.3. Fertilidad del verraco

La fertilidad de los cerdos macho reproductores o verracos está fuertemente influenciada tanto por la línea genética del animal y el individuo (Roca *et al.*, 2015), así como por la edad, estación, frecuencia de eyaculación y libido (Savić *et al.*, 2017).

El método clásico de evaluación del potencial de los verracos como tales es la de evaluación de una muestra de semen del animal realizado *in situ* en la propia granja previamente a la IA. Este análisis seminal básico consiste en una serie de pruebas sencillas y de bajo coste que comprenden el análisis del volumen de eyaculado, la concentración de espermatozoides, el número total de espermatozoides por eyaculado y la motilidad (Gadea, 2005).

El espermiograma básico se correlaciona de manera general con los datos de fertilidad de los animales, sin embargo, presenta limitaciones significativas puesto que no son útiles para

detectar pequeñas variaciones de fertilidad (subfertilidad) que suponen pérdidas económicas significativas para las granjas (Roca *et al.*, 2015). La subfertilidad hace referencia a la existencia de verracos con una calidad seminal aceptable, pero con una fertilidad reducida, inferior a la de los más fértiles, a causa de la existencia de daños moleculares, a pesar de que los espermatozoides cumplan con los estándares mínimos en los espermogramas básicos (Mellagi *et al.*, 2022). Se estima que la cantidad de verracos subfértiles se sitúa en torno al 10% y que la detección y retirada de los programas reproductivos de las granjas de esos machos daría como resultado 223 lechones más nacidos por camada por cada 100 cerdas inseminadas, lo cual supone una ganancia económica de 10.000 euros/año por cada 1000 cerdas (Roca *et al.*, 2015). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de desarrollo de técnicas avanzadas de análisis y detección de aquellos marcadores que puedan estar alterados en los machos subfértiles. En esta línea, en los últimos años se han ido implementando técnicas de análisis espermático basadas en el estudio de la cromatina espermática (Didion *et al.*, 2009; Broekhuijse *et al.*, 2012).

1.4. Estructura de la cromatina espermática

Los espermatozoides poseen una organización específica de la cromatina, en la que ésta está condensada de manera extrema por acción de las protaminas. Las protaminas son proteínas específicas del espermatozoide, altamente básicas y ricas en arginina. Su naturaleza fuertemente básica permite su asociación intensa con el ADN. Los residuos de cisteína también juegan un papel crucial en la compactación del ADN, mediante la formación de puentes disulfuro interprotamina e intraprotamina (Andrabi, 2007).

Esta compactación extrema es el resultado de la especialización necesaria para acometer la función de los espermatozoides. Por un lado, permite la adquisición de una forma de cabeza más hidrodinámica que facilitará el desplazamiento hasta el ovocito y, por otro, protege el ADN paterno de los agentes genotóxicos que se puede encontrar en su recorrido. Además, están involucradas en la regulación de diferentes procesos epigenéticos.

En las espermatogonias y los espermatoцитos de la línea germinal masculina, la cromatina presenta una organización idéntica a la de las células somáticas, es decir, el ADN está asociado a histonas (Noblanc *et al.*, 2014). La unidad básica de la cromatina de las células asociadas a histonas es el nucleosoma, formado por una longitud de doble hélice de ADN de 146 pb enrollada alrededor de un octámero de histonas, constituido por dos unidades de cada uno de los diferentes tipos de histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Andrabi, 2007). Existe una quinta histona,

la H1 que sirve de conexión entre nucleosomas contiguos, unida al ADN conector (Noblanc *et al.*, 2014).

Durante la espermiogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas, lo que compacta la cromatina y se reduce drásticamente el volumen nuclear. Este intercambio se inicia y está dirigido por una serie de modificaciones postraduccionales de las histonas, como la hiperacetilación de las histonas y el intercambio de algunas de las histonas canónicas por variantes de histonas. Estas modificaciones promueven la degradación de las histonas en el proteasoma y su sustitución por proteínas de transición, proteínas de pequeño tamaño molecular de mayor basicidad que las histonas pero menor que las protaminas. Finalmente, en las espermátides tardías, las proteínas de transición son reemplazadas por protaminas, como se muestra en el esquema de la Figura 1.

Algunos autores, en cambio, sugieren que el intercambio no requiere necesariamente del paso de proteínas de transición; sino que la función de estas es dirigir la sustitución de histonas por protaminas, pero que en ausencia de proteínas de transición el ensamblaje de protaminas tendría lugar en niveles subóptimos (Barral *et al.*, 2017).

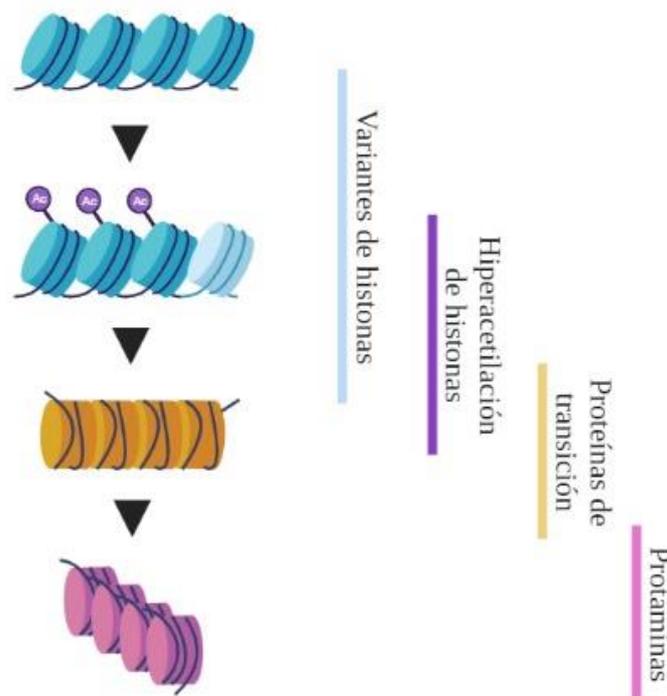


Figura 1. Representación gráfica del proceso de remodelado de la cromatina espermática durante la espermiogénesis. Elaboración propia en Biorrender.com

Los mamíferos presentan dos tipos de protaminas: la protamina 1 (PRM1), común en todas las especies, y la protamina 2 (PRM2), exclusiva de algunas de ellas. Aunque los cerdos y los

toros poseen el gen *prm2*, que codifica para PRM2, éste no se expresa en estas especies. La asociación de las protaminas con el ADN conduce a la formación de una superestructura toroidal, que consiste en una serie de complejos de ADN-protamina de unas 50 kb, de 60-100 nm de diámetro y 20 nm de grosor. Los toroides están unidos por una región de ADN no asociado a protaminas que recibe el nombre de región enlazadora toroidal.

El alto contenido en arginina hace que las protaminas se unan fuertemente al esqueleto de pentosas fosfato del ADN por atracciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. Su contenido en cisteínas permite la formación de los citados puentes disulfuro interprotamina e intraprotamina, que facilitan la compactación de la cromatina. Estos puentes disulfuro permiten la estabilización de los toroides y su resistencia a agentes genotóxicos como nucleasas y ROS.

La sustitución de las histonas por protaminas no es completa, sino que se estima que persisten entre el 1 % y el 2 % de las histonas en el ADN del espermatozoide maduro. Se ha observado que estas histonas son abundantes en regiones involucradas en genes del desarrollo embrionario, genes con impronta y genes involucrados en la espermatogénesis (Pesch y Bergmann, 2006; Andrabi, 2007; Noblanc *et al.*, 2014; Rathke *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2019).

1.5. Fragmentación del ADN espermático

La cromatina se caracteriza por una disposición lineal de los nucleótidos a lo largo de cada hebra de ADN y la ausencia de roturas de hebras simples o dobles (Esteves *et al.*, 2021). La fragmentación del ADN espermático consiste en la pérdida de integridad de la molécula, es decir, la aparición de roturas de cadenas simple o de doble cadena que resulta en una posible pérdida o alteración de la información genética (Evenson, 2016) y se trata de la forma de daño en el ADN espermático más estudiada en los laboratorios de andrología (Alahmar *et al.*, 2022). Las roturas de una sola hebra dan lugar a extremos 5'-3' libres, que afectan solo a una cadena de ADN, mientras que la complementaria permanece intacta. Las roturas dobles se caracterizan por la presencia de extremos romos 5'-3' que afectan a ambas hebras. Estos daños pueden ocurrir durante la espermatogénesis, la espermiogénesis, el tránsito por el epidídimo o tras la eyaculación.

Entre las causas de estas roturas se encuentra la exposición a sustancias tóxicas, el envejecimiento y las infecciones, que desencadenan a nivel celular defectos en el empaquetamiento y maduración de la cromatina, apoptosis y estrés oxidativo (Esteves *et al.*, 2021). A nivel celular, se han propuesto múltiples factores involucrados en la fragmentación del ADN espermático: el estrés oxidativo, la activación de endonucleasas y caspasas endógenas,

alteraciones del proceso de remodelado de la cromatina durante la espermiogénesis y la apoptosis abortiva de células germinales al principio de la meiosis (Agarwal *et al.*, 2020).

1.6. Oxidación de la cromatina espermática

La mayor parte de pruebas sobre las alteraciones del ADN espermático, recogen datos sobre etapas de daño avanzadas, como las relativas a fragmentación, pero brindan poca información sobre las causas iniciales de estos daños. Una línea de investigación emergente a la hora de detectar con precisión problemas de fertilidad puede ser estudiar las manifestaciones tempranas de estas alteraciones, como es la oxidación de bases en el ADN (Lewis, 2014).

La guanina es la base más susceptible de sufrir daño oxidativo, dando lugar a la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG). La presencia de estas formas oxidadas se ha observado en especial abundancia en las zonas del genoma asociadas a nucleosomas, concretamente en el ADN enlazador toroidal, probablemente debido a su localización nuclear periférica y su menor grado de compactación. No obstante, la detección de la 8OHdG no constituye un marcaje del total de la oxidación del ADN, sino una aproximación, ya que las otras bases también pueden sufrir oxidación (Rashki *et al.*, 2021). Según estudios en seres humanos, la presencia de esta forma oxidada de la guanina es 100 veces mayor en hombres infértiles que en fértiles, por lo que existe relación entre los niveles de oxidación del ADN espermático y la fertilidad masculina (Barati *et al.*, 2020).

La oxidación del ADN se produce como consecuencia de una situación de estrés oxidativo causado por la existencia de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS). El término ROS engloba varios metabolitos de oxígeno, como el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo, que contienen uno o más electrones desapareados, lo que los convierte en moléculas especialmente reactivas. Las principales fuentes endógenas son las mitocondrias espermáticas, las L-aminoácido oxidasas citosólicas y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasas de membrana plasmática. La interacción de los radicales hidroxilo con la guanina da lugar a la formación de 8OHdG. La reacción de adición de hidroxilo conduce a la generación de aductos por abstracción de electrones. La 8OHdG sufre tautomerismo ceto-enol y favorece la aparición de 8-oxo-7,8-dihidro-2-desoxiguanosina (Valavanidis *et al.*, 2009). No obstante, las ROS son producidas de forma fisiológica por los espermatozoides y están involucradas en la capacitación de los mismos, pero una acumulación de estos metabolitos conduce peroxidación lipídica en las membranas celulares y daño en el ADN (Aitken, 2017).

La reparación de los daños oxidativos en el ADN de los espermatozoides es limitada debido a que carecen de varias enzimas de la ruta de reparación por escisión de bases. Sólo poseen la primera enzima de la ruta, la 8OHdG ADN glicosilasa (OGG1). El ovocito es el encargado de continuar con la vía reparación antes del inicio de la fase S de l-a primera división meiótica (De Rosa *et al.*, 2021; Moazamian *et al.*, 2022).

Los sitios abásicos desestabilizan el esqueleto pentosas-fosfato y pueden conducir a una reacción de apertura del anillo de la ribosa, provocando en última instancia la rotura de la cadena de ADN, es decir, fragmentación de la cromatina espermática (Aitken *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 2016).

1.7. Técnicas de análisis de la cromatina espermática

El espermiograma ha resultado clave durante muchos años para la identificación de verracos o eyaculados con problemas de fertilidad. Los avances técnicos como el análisis de semen asistido por ordenador (*Computer-Assisted Sperm Analysis*, CASA) y la implementación de la citometría de flujo han permitido sistematizar los análisis y atender a nuevos parámetros de calidad espermática (Knox, 2016).

Sin embargo, los análisis espermáticos tradicionales en muchos casos resultan insuficientes para detectar a los individuos subfértiles. La tendencia actual de la industria porcina hacia la reducción del número de espermatozoides por dosis y el descarte de los verracos subfértiles ha impulsado la investigación en nuevos métodos para aumentar la fiabilidad de las predicciones de la fertilidad de los verracos. Estos métodos cumplen con la base común de que son mucho más objetivos y además ofrecen información que pasa desapercibida en el análisis seminal básico. Se trata de la evaluación del estatus del ADN espermático, análisis de integridad de membrana, estudios de proteómica, sistemas computarizados de análisis de ciertos parámetros de funcionalidad espermática como la motilidad (sistemas CASA) o la fertilidad in vitro. En cualquier caso, estas técnicas permiten, en muchas ocasiones, detectar pequeñas diferencias entre verracos o dosis de semen que son determinantes para la rentabilidad de la granja, ya que logran la identificación de los verracos subfértiles o más resistentes al almacenamiento de semen e incluso la predicción de la fertilidad a través del análisis multivariante y herramientas de inteligencia artificial (Mellagi *et al.*, 2022). Además, existe una amplia variedad de tinciones fluorescentes empleadas en la evaluación del estado y función de diferentes componentes celulares como el núcleo, la mitocondria o la integridad de membrana plasmática (Jung *et al.*, 2015).

La evaluación de la integridad del ADN espermático tiene un gran potencial como análisis moleculares complementarios a los protocolos tradicionales. Estas técnicas, aunque requieren equipamiento (citómetro de flujo, microscopio de fluorescencia, cromatógrafos) y personal especializado, pueden ofrecer al ganadero una útil herramienta de predicción de la fertilidad de sus animales (Dutta *et al.*, 2021).

Por un lado, el empaquetamiento de la cromatina espermática se puede cuantificar mediante la detección de las protaminas y el estudio de los enlaces disulfuro que forman los puentes inter e intraprotamina. Ésta última variable se puede determinar empleando monobromobimano (mBBr) (Al-Kass *et al.*, 2023; Maside *et al.*, 2023). El mBBr es una sonda fluorescente que reacciona con los grupos sulfhidrilo libres que muestra una fluorescencia azul tras la reacción y formación del tioéter. Constituye una medida de los grupos sulfhidrilo libres con respecto a los que se encuentran formando puentes disulfuro, de manera que a mayor fluorescencia mBBr hay mayor cantidad de sulfhidrilos y menos puentes disulfuro inter e intraprotamina, es decir, una mayor intensidad de fluorescencia es indicativo de una disminución del estado de compactación de la cromatina (Winther y Thorpe, 2014; Lacalle *et al.*, 2023).

La oxidación de las bases nitrogenadas del ADN se puede determinar mediante inmunofluorescencia, empleando anticuerpos dirigidos contra la forma oxidada de la guanina, como la 8OHdG (Soria-Meneses *et al.*, 2019).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es la detección de daños en la cromatina espermática de cerdos macho reproductores (verracos) que pasan inadvertidos en el análisis seminal básico utilizado de rutina en granjas para la evaluación de la calidad espermática.

Los objetivos específicos son, por un lado, el estudio del efecto del almacenamiento prolongado de dosis de semen de IA sobre el estado de reducción de los puentes disulfuro y la oxidación de las bases nitrogenadas del ADN, y, por otro, la evaluación de la variación de estos parámetros con la edad del animal y la estacionalidad.

3. Material y métodos

3.1. Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados en los laboratorios del grupo de investigación REPROBIO del Instituto de Desarrollo Ganadero y Salud Animal (INDEGSAL), perteneciente a la Universidad de León.

Se obtuvieron muestras de cada macho por duplicado, en semanas consecutivas. Una vez en el laboratorio, el volumen total de cada muestra se dividió en 2 partes, una para el procesamiento y análisis en el mismo día de obtención (D0), y otra parte se mantuvo en refrigeración a 17 °C durante 11 días para su procesamiento y análisis posterior (D11).

Las muestras de D0 y D11 fueron procesadas para la congelación de los espermatozoides para análisis de cromatina.

Tras la descongelación de las muestras, se realizó el análisis por citometría de flujo de la oxidación en la cromatina espermática mediante el anticuerpo FITC-anti-8OHdG y la cuantificación de los niveles de grupos sulfhidrilos libres en los espermatozoides mediante mBBr.

Mediante citometría de flujo se determinó la media de intensidad de fluorescencia (MFI: *Mean Fluorescence Intensity*) de mBBr y de 8OHdG (Figura 2). Posteriormente, con los datos de MFI de mBBr, se calculó la cantidad de puentes disulfuro (*disulfide bridges*, DB) presentes en las muestras.



Figura 2. Diseño experimental. 1) Recogida del eyaculado en el Centro Tecnológico de AIM Ibérica (Campo de Villavidel, León, España) de muestras de 11 machos. 2) Procesamiento de las muestras en día 0 (D0) o almacenamiento en refrigeración a 17 °C durante 11 días (D11). 3) Procesamiento de las muestras, tanto de D0 como de D11, para la sustitución del diluyente espermático por el medio de congelación TNE. 4) Congelación y preservación de las muestras a -80 °C hasta su análisis. 5) Procesamiento de las muestras con un marcador fluorescente específico (monobromobimano, mBBr) para la determinación de los grupos sulfhidrilo libres. 6) Procesamiento de las muestras con un marcador fluorescente específico (FITC-anti-8-hidroxi-2-desoxiguanosina, FITC-anti-8OHdG) para la determinación del estado de oxidación del ADN. 7) Análisis por citometría de flujo. Elaboración propia con BioRender.com.

3.2. Reactivos, soluciones y medios

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Aldrich (San Luis, EE.UU.), a menos que se indique de otro modo.

La solución salina tamponada con fosfato (PBS) se compuso de 140 mM de NaCl (S5886), 15 mM de KCl (P5405), 7 mM de Na₂HPO₄ (S5136) y 1,5 mM de KH₂PO₄ (S5136), ajustando el pH a 7,2.

El medio Tris-NaCl-EDTA (TNE) (Evenson y Jost, 2000) para congelación de espermatozoides y extracción de ADN se compuso de 10 mM de Tris-HCl (T5941), 0,15 M de NaCl (S9625) y 0,1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; E1644) ajustando el pH a 7,4.

La solución de ditioneitol (DTT; 426380500, Acros Organics, Madrid, España), para la reducción de puentes disulfuro del ADN, se preparó a concentración 1 mM en PBS.

La solución de tinción de monobromobimano (mBBR; B4380) para la detección de los grupos sulfhidrilos libres, se preparó a una concentración de trabajo de 500 µM de mBBR en PBS partiendo de una solución intermedia de mBBR a 50 mM en DMSO almacenada a -20 °C en oscuridad.

La solución de yoduro de propidio (IP; P4170), para el marcaje del ADN, se preparó en agua ultrapura una concentración de 1,5 mM y se mantuvo a -20 °C en oscuridad hasta su empleo.

La solución de tinción de bis-bencimida (Hoechst 33342, H342; B2261), para el marcaje de los núcleos celulares, se preparó a una concentración 1 mg/ml en agua (2,7 µM).

La solución de peróxido de hidrógeno se preparó a una concentración de trabajo de 3,3 mM en PBS en el momento de uso a partir de la solución Hydrogen Peroxide Solution 30% (w/w) in H₂O (H₂O₂; H1009).

La solución de albúmina sérica bovina (BSA; A7906) al 0,5 % (m/v) se elaboró en PBS.

La solución de fijación de paraformaldehído (PFA; Fisher Scientific BP531-25, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) al 4% se preparó a partir de Formaldehído al 37% en PBS.

La solución de permeabilización se compuso de tritón (Tritón X-100; T9284) al 0,1% y citrato (Citrato trisódico dihidratado, 71402) al 0,1% en PBS.

La solución de anticuerpo FITC-anti-8OHdG (FITC Anti-DNA/RNA Damage antibody [15A3] (abcam ab183393, Cambridge, Reino Unido) a una concentración 1:150 en solución de BSA 0,5%.

3.3. Obtención de las muestras biológicas

Los técnicos del Centro de Inseminación Artificial de AIM Ibérica (Campo de Villavidel, León) extrajeron las muestras por el método manual a 11 machos de las líneas genéticas Landrace y Large White. Las dosis comerciales fueron preparadas diluyendo la fracción rica del eyaculado en un diluyente comercial específico para preparación de dosis de IA de la especie porcina (*Beltville Thawing Solution*, BTS) hasta un volumen de 80 ml totales y una concentración de 28×10^6 espermatozoides/mL. Las dosis comerciales fueron trasladadas al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración a 17 °C hasta su análisis.

3.4. Preparación y congelación de las muestras biológicas

El tratamiento de las muestras para la eliminación del diluyente de la dosis de IA consistió en la doble centrifugación a 500 g durante 3 min a temperatura ambiente (25 °C). Tras cada centrifugación, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en un volumen de PBS igual al inicial de la muestra. Después de la última centrifugación, el precipitado celular se resuspendió en un volumen de TNE igual al inicial de la muestra para la conservación estable de la cromatina en congelación. Las muestras procesadas se dividieron en alícuotas de 1 mL y se congelaron a -80 °C hasta su análisis.

3.3. Determinación de los grupos sulfhidrilo libres en espermatozoides

Para la detección de los niveles de grupos sulfhidrilos libres en espermatozoides se descongelaron las muestras previamente almacenadas en TNE a -80 °C en un baño de agua a 37 °C durante un minuto y se dispusieron en placas de 96 pocillos (10174221, Thermo Fisher Scientific SL, Madrid, España) con 1 muestra/pocillo. A partir de este punto y durante todo el protocolo, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C o rodeadas de hielo salvo en los periodos de incubación específicos que se detallan a continuación.

Se procesó además un set de muestras en paralelo en otra placa de 96 pocillos como control positivo de cada muestra. Estas muestras control se pretrataron con solución de DTT en proporción 1:1 durante 10 min a 37 °C. Dado que el DTT es irritante, se realizó su manipulación en cabina extractora de gases. Pasado el tiempo de incubación con DTT, tanto las muestras problema como los controles positivos fueron centrifugadas a $1.000 \times g$ durante 11 min a 4 °C (condiciones estándar de centrifugación).

Tras la centrifugación, se realizó la eliminación del sobrenadante por volcado de las muestras, y resuspensión de lavado en 100 μ L de PBS/muestra y homogenización por pipeteo con pipeta manual multicanal. Pasado este tiempo se empezó a trabajar con ambas placas sobre hielo, añadiendo en las dos 100 μ L de PBS/pocillo para lavar las muestras, posteriormente se centrifugaron en las condiciones estándar y se eliminó el sobrenadante por volcado.

Se añadieron 100 μ L de solución de mBBr/pocillo y se homogeneizaron por pipeteo para dejarlo incubar durante 10 min a 37 °C. Se añadieron 100 μ L de PBS/pocillo para lavar las muestras y se volvieron a centrifugar a en las condiciones estándar, para posteriormente decantar el sobrenadante por volcado.

Por último, se añadieron 250 μ L de la solución de trabajo de la tinción de PI/pocillo y se resuspendieron por pipeteo. Las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo o se mantuvieron a 4 °C para su análisis en un periodo máximo de 24 horas.

Para el cálculo de DB, se aplicó el método sugerido por Zubkova *et al.* (2005), consistente en la diferencia de los tioles totales (tratamiento con DTT) y los tioles libres, que representa el número de tioles que formaban parte de los puentes disulfuro antes de la reducción con DTT. La división de los tioles entre dos ofrece el número de puentes disulfuro de cada muestra.

3.5. Determinación de la oxidación de las bases nitrogenadas

Para el análisis de los niveles de oxidación de la cromatina espermática, se descongelaron las muestras en un baño a 37 °C durante 1 minuto. Se dispusieron 200 μ L de cada muestra por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió una muestra estándar, de nivel de oxidación conocido, en dos pocillos como controles. Para la retirada del medio de congelación de las muestras, las placas muestras se centrifugaron a unas condiciones estándar de centrifugación. Se retiró el sobrenadante mediante el volcado de la placa.

Uno de los pocillos de la muestra estándar fue resuspendido en 100 μ L de solución de H₂O₂ a concentración de 3,3 mM. Se mantuvieron a en una estufa a 25 °C durante 1 h. El resto de muestras se incubaron en las mismas condiciones en PBS. Posteriormente, a cada pocillo se añadió 200 μ L de PBS a cada pocillo y se centrifugaron en las condiciones estándar descritas anteriormente.

Se retiró el sobrenadante por volcado y se resuspendió el precipitado celular en 150 μ L de la solución de fijación de PFA al 4%. Las muestras se incubaron durante 20 min en refrigeración y agitación. A continuación, se añadieron 100 μ L de solución de BSA al 0,5% para lavar las

muestras. Las placas se centrifugaron una vez más en las condiciones estándar y se eliminó el sobrenadante por volcado.

El precipitado celular se resuspendió en 150 μ L de la solución de DTT para provocar la reducción de los puentes disulfuro de las muestras y, así, la descondensación de la cromatina espermática para que se facilite la unión específica del anticuerpo a sus sitios diana. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de solución de BSA al 0,5% para lavar las muestras y se volvió a centrifugar la placa de muestras en las condiciones establecidas.

Se eliminó el sobrenadante por volcado y se resuspendieron las muestras en 150 μ L de la solución de permeabilización de tritón 0,1% en citrato 0,1%. Las muestras se incubaron para la permeabilización de las células en refrigeración y agitación. Para un nuevo lavado, se añadieron 100 μ L de solución de BSA al 0,5% y se repitieron las condiciones de centrifugación y retirada de sobrenadante por volcado anteriormente descritas.

Se resuspendió el precipitado celular en 200 μ L de solución de anticuerpo FITC-anti-8OHdG. Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente y en agitación suave durante 1 h. Tras esto, se añadieron 100 μ L de solución de BSA al 0,5 % para el lavado de las muestras y se procedió a la centrifugación y retirada de sobrenadante como se ha descrito anteriormente.

Se resuspendió el precipitado celular de cada pocillo en 250 μ L de la solución de tinción de H342 hasta una concentración final de 2,7 μ M y se mantuvieron en incubación durante 20 min a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron a continuación por citometría de flujo.

3.6. Análisis por citometría de flujo

Una vez realizado el procesamiento de las muestras por las técnicas previamente citadas, fueron analizadas en un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) que consta de tres láseres: violeta (405 nm), azul (488 nm) y rojo (635 nm). Para la detección de fluorescencia de los diferentes fluorocromos se utilizaron los fotodetectores 450/50 nm para H342 y 424/44 nm para mBBR en el canal violeta, 525/550 nm para FITC-anti-8OHdG en el canal verde y 655/730 nm para PI en el canal azul. La adquisición de datos se realizó mediante el software MACSQuantify™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Los espermatozoides fueron identificados utilizando puertas adecuadas en los citogramas FSC/SSC (dispersión frontal/lateral), que selecciona aquellos eventos que por tamaño y complejidad pueden ser espermatozoides, y H342/SSC (eventos H342+ como espermatozoides) o IP/SSC (eventos IP+ como espermatozoides), que selecciona los eventos

con ADN marcado por H342 o PI, respectivamente, dependiendo del análisis realizado. Se adquirieron al menos 10.000 eventos IP+ o H342+ por muestra.

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de citometría de flujo fueron analizados mediante un modelo lineal de efectos mixtos (LME) con un paquete estadístico R (R Core Team, 2021). Se consideraron el día de muestreo (D0 y D11) como factor fijo y el macho y réplica como factores aleatorios. Se obtuvieron los resultados como la media de los parámetros medidos \pm error estándar de la media (SEM). Se realizó además una correlación de Pearson entre las variables. El nivel de significación considerado en todos los casos fue de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Reducción de puentes disulfuro de la cromatina espermática con el almacenamiento de las dosis

Los resultados de intensidad de fluorescencia media de mBBr (MFI-mBBr) mostraron un incremento significativo en las muestras D11 (Figura 3), tanto en enero (D0: $0,931 \pm 0,043$; D11: $1,153 \pm 0,069$; $p < 0,001$), como en junio (D0: $0,925 \pm 0,062$; D11: $1,064 \pm 0,083$; $p < 0,001$). Además de que MFI-mBBr se redujo a D11 en ambas épocas del año, los resultados de MFI-mBBr de enero fueron significativamente inferiores a los de junio ($p < 0,05$).

Por otro lado, DB se redujo de forma significativa a D11 (Figura 4), tanto en enero (D0: $33,8 \pm 2,2$; D11: $21,9 \pm 3,5$; $p < 0,001$), como en junio (D0: $28,2 \pm 3,0$; D11: $21,6 \pm 4,2$; $p < 0,001$). Comparando las dos épocas del año, los niveles de DB fueron significativamente menores en las muestras de junio que en las de enero ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que en las muestras tomadas en junio la cromatina espermática experimentó una menor compactación durante la maduración del espermatozoide.

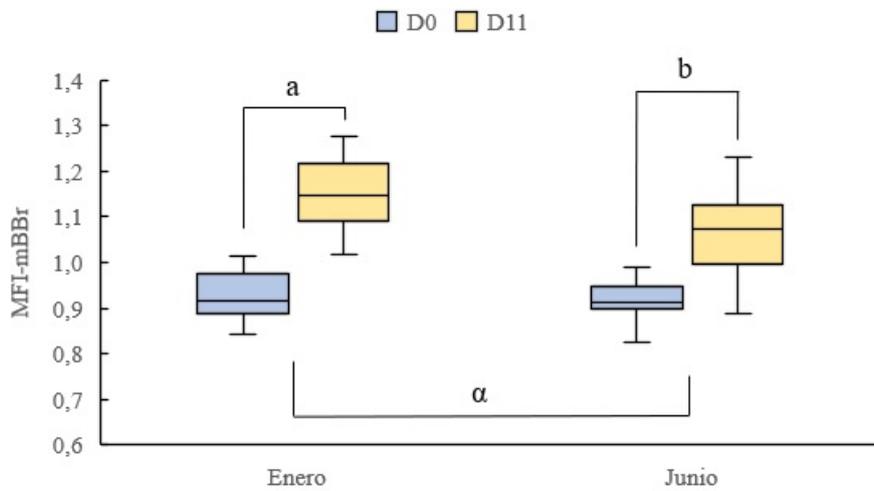


Figura 3. Representación gráfica de la intensidad de fluorescencia media de monobromobimano (MFI-mBBr) a D0 y tras la preservación en refrigeración a D11 de dosis de inseminación de verracos recogidas en dos épocas distintas del año (enero y junio). Las muestras se analizaron mediante un modelo lineal de efectos mixtos. Las letras latinas (a y b) muestran diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$). Las letras griegas (α) muestran diferencias estadísticas entre épocas del año ($p < 0,05$).

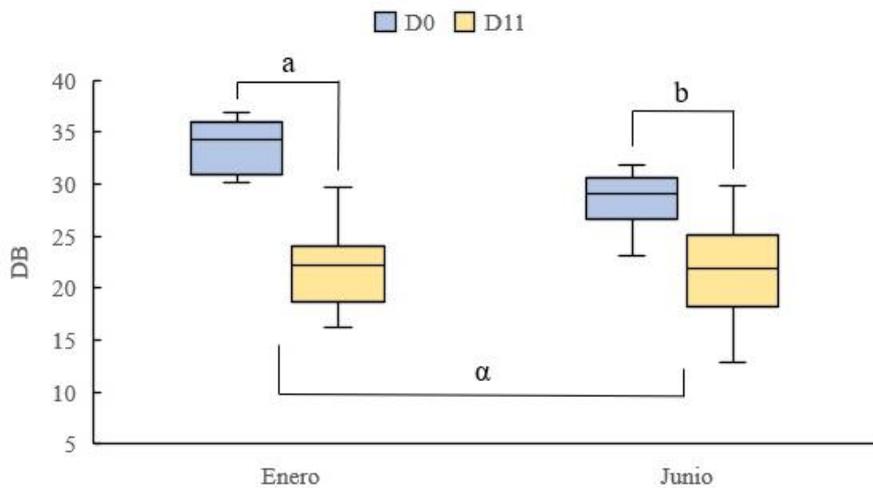


Figura 4. Representación gráfica de la cantidad de puentes disulfuro (DB) a D0 y tras la preservación en refrigeración a D11 de dosis de inseminación de verracos recogidas en dos épocas distintas del año (enero y junio). Las muestras se analizaron mediante un modelo lineal de efectos mixtos. Las letras latinas (a y b) muestran diferencias significativas entre grupos ($p < 0,001$). Las letras griegas (α) muestran diferencias estadísticas entre épocas del año ($p < 0,05$).

4.2. Oxidación del ADN espermático con el almacenamiento de las dosis

En cuanto a los resultados sobre los niveles de oxidación de las bases nitrogenadas, la intensidad de fluorescencia media (MFI-8OHdG) no mostró variación significativa en las muestras D11 con respecto a las de D0 (Figura 5), tanto en enero (D0: $2,846 \pm 0,162$; D11: $2,875 \pm 0,182$; $p=0,578$), como en junio (D0: $3,66 \pm 0,304$; D11: $3,658 \pm 0,284$; $p=0,966$). Además, la MFI-8OHdG experimentó un incremento significativo en las muestras de junio ($p<0,001$). Por tanto, los niveles de oxidación en el ADN espermático ascendieron en las muestras tomadas en junio comparadas con las tomadas en enero.

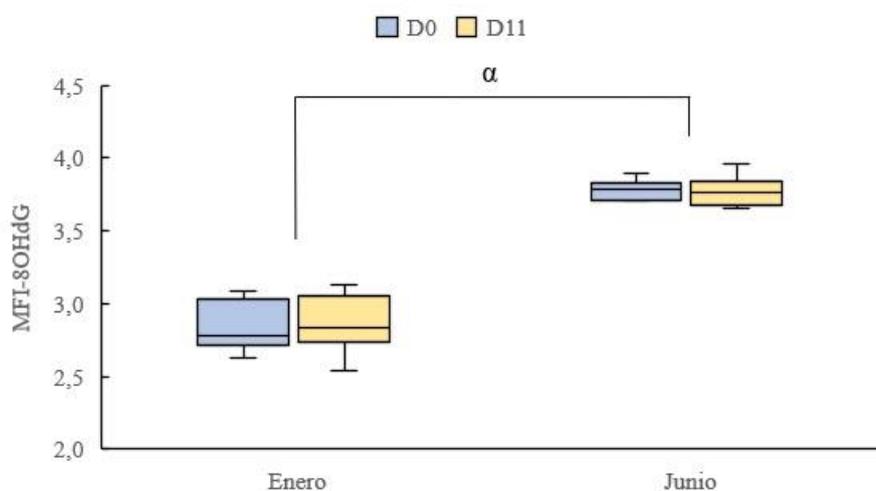


Figura 5. Representación gráfica de la oxidación de las bases nitrogenadas como la intensidad de fluorescencia media de FITC-anti-8OHdG (MFI-8OHdG) a D0 y tras la preservación en refrigeración a D11 de dosis de inseminación de verracos recogidas en dos épocas distintas del año (enero y junio). Las muestras se analizaron mediante un modelo lineal de efectos mixtos. Las letras griegas (α) muestran diferencias estadísticas entre épocas del año ($p<0,001$).

4.3. Correlación entre variables

El estudio de correlación de Pearson mostró una correlación negativa significativa entre MFI-mBBr y DB ($r=-0,88$; $p<0,001$) y una ligera, aunque significativa correlación negativa entre MFI-mBBr y MFI-8OHdG ($r=-0,24$; $p<0,05$). Los resultados no mostraron correlación significativa entre DB y MFI-8OHdG ($r=-0,15$; $p>0,05$).

La relación entre la condensación de la cromatina espermática, representada por la cantidad de puentes disulfuro, es inversa con respecto a la oxidación del ADN, aunque con un menor coeficiente de correlación que en el caso anterior. Esto significa que un mayor grado de condensación de la cromatina espermática se relaciona con una menor oxidación del ADN y viceversa.

5. Discusión

En la industria porcina, la técnica de rutina utilizada en los programas de reproducción con IA parte del almacenamiento del semen a 17-18 °C hasta el momento de la inseminación. La aplicación de protocolos de congelación y vitrificación no es usual, debido a la sensibilidad de los espermatozoides de verraco a los cambios osmóticos y de temperatura, por lo que el procedimiento mayoritario es la preservación del semen líquido extendido en refrigeración (Pezo *et al.*, 2019).

No obstante, la preservación del semen en refrigeración no está exenta de inconvenientes. El almacenamiento de semen tiene un efecto negativo sobre la integridad de la cromatina de cerdo, como se ha observado en diversos estudios realizados con la técnica de análisis de la fragmentación del ADN espermático *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA). Se trata de un tema de vital importancia para el sector porcino porque la integridad del ADN está correlacionada con la fertilidad de los verracos y eyaculados (Bielas *et al.*, 2017). Los experimentos de Boe-Hansen *et al.* (2005), en los que se utilizó la técnica SCSA para valorar la integridad de la cromatina espermática en semen de verraco extendido y almacenado a 18 °C durante 72 h tras el eyaculado, mostraron un aumento de la fragmentación de la cromatina espermática con el almacenamiento. A pesar de que en el estudio de Bielas *et al.* (2017), en el que se empleó la técnica SCSA para evaluar la integridad de la cromatina espermática en dosis seminales de verracos, extendidas y refrigeradas a 17 °C durante 240 h, también se produjo un aumento significativo de la fragmentación de ADN con el tiempo de almacenamiento del semen, los cambios fueron relativamente pequeños. Estos resultados respaldan la idea de que la prueba SCSA tiene pequeño valor relativo para la evaluación de los cambios en las características del espermatozoide de verraco durante la preservación del semen en refrigeración (Bielas *et al.*, 2017).

Esto abre la puerta a la implementación de técnicas de análisis de mayor precisión en la detección de daños tempranos en la cromatina espermática, como son la evaluación de la oxidación del ADN, que es uno de los factores de riesgo y causas principales de la fragmentación del mismo; y la valoración del estado de compactación de la cromatina espermática, que constituye uno de los principales sistemas de defensa para el mantenimiento de la integridad del material genético del espermatozoide. Estos son los dos parámetros analizados en el presente trabajo.

Los resultados de este trabajo muestran que el almacenamiento de las dosis de IA de 11 machos reproductores a 17 °C durante 11 días tras el eyaculado, conllevó un aumento muy significativo de la descondensación de la cromatina, representada por disminución de la cantidad de puentes disulfuro interprotamina e intraprotamina y la mayor proporción de grupos tioles libres. Estos resultados constatan la tendencia observada por Khezri *et al.* (2019), en cuyo experimento se produjo también una disminución de la cantidad de puentes disulfuro con el almacenamiento de las dosis de IA a 18 °C durante cuatro días tras el eyaculado, valorado con la sonda mBBBr. Además, presentó una correlación significativa pero débil con el aumento de la fragmentación de la cromatina.

Por otra parte, no existen muchos estudios que aborden el efecto de la preservación sobre el estatus oxidativo del ADN de espermatozoides en mamíferos. En el estudio realizado por Pérez-Cereales *et al.* (2009), se analizaron los efectos del almacenamiento a 4 °C a corto plazo de semen de trucha arco iris mediante la aplicación del ensayo Comet combinado con digestión con endonucleasas que cortan en bases oxidadas, para la detección de las bases nitrogenadas oxidadas. Con este método registraron un aumento de eventos oxidativos en el ADN con los días de almacenamiento. Estos podrían tener su origen en la presencia de células necróticas y apoptóticas. Las células muertas aumentan los niveles de ROS, contribuyendo a eventos oxidativos en células viables.

Sin embargo, las condiciones de este experimento son bastante diferentes al nuestro, como el origen del semen, testicular y no procedente de un eyaculado; o las diferencias entre especies, cerdo y trucha arco iris. En nuestro experimento, los niveles de oxidación de las bases nitrogenadas, representados por la forma oxidada de la base nitrogenada guanina, la 8OHdG, no variaron de manera significativa a lo largo de los 11 días de almacenamiento de las dosis de IA.

Una explicación para la ausencia de oxidación de cambios en los niveles de oxidación del ADN, a pesar de la descondensación de la cromatina constatada con la sonda mBBBr, que *a priori* implicaría una mayor exposición del material genético a la acción de las ROS podría ser la actuación del sistema antioxidante del espermatozoide. El semen de cerdo contiene cantidades notables de la enzima superóxido dismutasa intracelular, que transforma el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque es cierto que posee niveles intracelulares más bajos de la enzima catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua. Otra opción es la adición de antioxidantes naturales o sintéticos a los diluyentes de semen, como

las mencionadas enzimas catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa, la glutatión S-transferasa, o compuestos no enzimáticos como el ácido ascórbico, el tocoferol y compuestos fenólicos (Pezo *et al.*, 2021).

La calidad seminal está condicionada por múltiples factores como la variabilidad individual, la raza, la estación, el origen de la muestra (eyaculado/epidídimo) y la composición del plasma seminal (Zasiadczyk *et al.*, 2015), muchos de los cuales son también cruciales para la fertilidad en campo del cerdo (Savić *et al.*, 2017). Los factores con mayor efecto son las variaciones estacionales y la variabilidad individual de los machos. La estacionalidad reproductiva es un rasgo heredado de su antepasado, el jabalí europeo (*Sus scrofa ferus*), cuya actividad reproductiva tiene lugar en los meses de finales de invierno y principios de primavera, mientras que no presentan actividad reproductiva en verano y principios de otoño. Entre los principales factores ambientales reguladores de la estacionalidad reproductiva en el cerdo, se encuentran el fotoperiodo y la temperatura (Zasiadczyk *et al.*, 2015).

La edad de los machos es otro factor relacionado con la calidad espermática. El envejecimiento conlleva una serie de cambios fisiológicos que afectan a los testículos, las vesículas seminales, la próstata y el epidídimo, además de alteraciones en las hormonas sexuales. En estudios realizados en humanos, se ha observado un aumento de la fragmentación de la cromatina espermática con la edad de los donantes, consecuencia de una disminución de la función testicular y de la producción de semen (Evenson *et al.*, 2020). Sin embargo, en la especie porcina parece suceder lo contrario. La práctica habitual en las granjas es la introducción de los machos en los programas de reproducción al inicio de su vida reproductiva. En ocasiones, estas inclusiones tempranas tienen un efecto negativo sobre la fertilidad, como han demostrado Ausejo *et al.* (2021), en cuyo trabajo exponen que a medida que avanza la pubertad se produce un incremento de los parámetros de calidad seminal del espermograma básico, además de una disminución de la fragmentación del ADN; hasta llegar a los 2 años de edad, momento en el cual se estabilizan.

Nuestros resultados se alejan de lo que cabría esperar según lo observado por Ausejo *et al.* (2021), ya que mostraron una disminución de la cantidad de puentes disulfuro, y, por tanto, una descompactación de la cromatina espermática de los verracos de mayor edad, lo cual se relaciona con una menor protección del ADN y una mayor fragmentación del mismo. Este periodo de tiempo entre la toma de muestras es significativo en la vida reproductiva de los verracos de interés comercial, cuya vida útil promedio en los programas de reproducción no

supera los 2 años, a pesar de que pueden llegar a vivir más de 10. La mayoría de los machos que ingresan en los programas reproductivos de las granjas no se mantienen en ellos durante periodos prolongados debido al sacrificio por agresividad, disminución de la calidad espermática o problemas con pies, patas y tamaño corporal (Koketsu y Sasaki, 2009). Esto implica que dentro de los programas reproductivos solamente existen machos jóvenes en constante renovación, y para los que 6 meses de diferencia de edad no suponen una alteración significativa de sus características fisiológicas o valor reproductivo, como señala el mencionado trabajo de Ausejo *et al.* (2021).

Por otro lado, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Zubkova *et al.* (2005) en su estudio con ratas jóvenes (cuatro meses) y ratas de edad avanzada (21 meses). En este trabajo se produjo también una descondensación de la cromatina espermática, con un 25% menos de puentes disulfuro, determinados por medio de mBBBr, en el grupo de mayor edad. Sin embargo, conviene recordar que en nuestro estudio la diferencia de edad es menor (6 meses) y los cerdos de mayor edad (junio) son aún considerados jóvenes.

Aunque apenas se han encontrado investigaciones que aborden el tema específico del estado de condensación de la cromatina con la edad en cerdos, el estudio realizado por Paoli *et al.* (2019) en humanos arroja luz sobre los posibles mecanismos moleculares implicados. En él, se comprobó la presencia de un perfil de PRM1 y PRM2 alterado en individuos de edad avanzada, en los que también se observó una disminución integridad de ADN espermático. Esta expresión anómala de protaminas podría ser una de las causas por las que se produce una disminución en la formación de puentes disulfuro en nuestro estudio, aunque conviene recordar que en cerdo solamente se expresa la PRM1. Estos cambios en el empaquetamiento podrían deberse a la acumulación de mutaciones en el ADN espermático como consecuencia de la replicación constante de las células germinales, un engrosamiento de la membrana basal, una disminución del número de células de Sertoli, así como por disminución de la capacidad antioxidante del epidídimo.

Otro factor que podría tener influencia en la disminución de los puentes disulfuro con la edad es la exposición prolongada a agentes externos que alteran el empaquetamiento de la cromatina, como los disruptores endocrinos o los metales pesados. No obstante, es necesaria más investigación para dilucidar los mecanismos por los cuales los contaminantes ambientales afectan a la cromatina espermática y a la fertilidad de los machos (Muratori y De Geyter, 2019).

Estos cambios en el empaquetamiento pueden provocar que los espermatozoides se vuelvan más vulnerables al daño oxidativo con la edad como expone Zubkova *et al.* (2005), lo cual no se corresponde con nuestros resultados. Aunque es cierto que aumentan los niveles de oxidación en la colección espermática de junio con respecto a la de enero, la resistencia al estrés oxidativo durante el almacenamiento 11 días a 17 °C se mantiene. Por tanto, el estudio conjunto de estos dos parámetros sugiere que en los machos de mayor edad o, cuyo semen fue recolectado en la estación cálida y con más horas de luz, se producen alteraciones del remodelado de la cromatina que llevan a un menor grado de empaquetamiento, lo que a su vez puede constituir una de las causas del incremento de la oxidación de las bases nitrogenadas en los nuevos espermatozoides generados, al estar más desprotegidos. Además, los resultados del test de correlación de Pearson realizado también muestran que, aunque de manera ligera, existe relación entre la presencia de grupos tioles libres, lo cual implica un menor grado de empaquetamiento de la cromatina, con la mayor oxidación de las bases nitrogenadas. Sin embargo, la función protectora del sistema antioxidante del espermatozoide no se ve alterada, puesto que no se incrementan los niveles de oxidación de las bases nitrogenadas.

También se ha demostrado el efecto de la edad en los niveles de oxidación del ADN espermático, con una tendencia similar a la de nuestro trabajo. En este estudio se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia para la detección de la 8OHdG en ratones divididos en grupos de edad de 2, 8 y 20 meses y se constató un aumento significativo de los niveles de oxidación en los grupos de mayor edad. Además, también se empleó el marcaje con mBBr, lo cual permitió establecer una posible correlación entre la oxidación del ADN y la descondensación de la cromatina. En este caso, el grupo de espermatozoides procedentes de machos de mayor edad (20 meses) también mostró un aumento del porcentaje de tioles libres, entendido como una menor condensación de la cromatina espermática (Ozkosem *et al.*, 2015). De nuevo, recordamos que en nuestro estudio los machos de ambas temporadas de recolección son considerados jóvenes y que la tendencia habitual en el cerdo es la mejora de los parámetros de calidad seminal, aunque no se han encontrado estudios concretos que evalúen el efecto de la edad sobre los parámetros de interés en este trabajo (compactación y oxidación de la cromatina).

Estas diferencias en la compactación de la cromatina y su estado oxidativo también podrían deberse, como se ha mencionado antes, a la estación de producción de la dosis de IA. Las altas temperaturas afectan a todos los tipos celulares del testículo, especialmente a las células germinales. Además de sus efectos sobre los parámetros básicos del análisis seminal, como la motilidad y la morfología, el estrés por calor desencadena la producción de ROS, que provocan

la apoptosis de las células germinales y daño en el ADN (Shahat *et al.*, 2020), como muestran nuestros resultados, en los que se incrementa la oxidación de las bases nitrogenadas en las muestras tomadas en la época de mayor temperatura (junio). El daño al ADN afecta al remodelado de la cromatina durante la espermiogénesis e inhibe la protaminación (Morrell, 2020), lo cual puede explicar la menor presencia de puentes disulfuro en las muestras de junio.

El aumento del estrés oxidativo en los meses de verano ya ha sido observado en otras investigaciones, como la realizada por Fraser *et al.* (2016), en la que se registró un mayor grado de peroxidación lipídica en los espermatozoides procedentes de eyaculados que habían tenido lugar en el periodo primavera-verano que en los del periodo otoño-invierno. Una de las causas de los mayores niveles de oxidación detectados en las muestras de junio, podría ser la disminución de la capacidad de los sistemas antioxidantes del plasma seminal y los fluidos del tracto reproductivo de los verracos durante el periodo primavera-verano (Koziorowska-Gilun *et al.*, 2011). En el presente estudio, la disminución de la función antioxidante intracelular del espermatozoide no puede ser la explicación, ya que esta se mantiene, como demuestran los resultados de oxidación de las bases nitrogenadas para la preservación de las dosis en refrigeración. No obstante, puede que el tiempo que el espermatozoide pasa en contacto con el plasma seminal y los fluidos del tracto reproductivo masculino con unos sistemas antioxidantes deteriorados tenga un efecto sobre el estatus oxidativo del ADN.

Estos cambios inducidos por el fotoperiodo y la temperatura ambiental son parámetros controlados en los centros de producción intensiva. Sin embargo, el efecto de la estación se ha demostrado en trabajos realizados en granjas con control de la temperatura y el fotoperiodo (Fraser *et al.*, 2016; Knecht *et al.*, 2017; Ausejo *et al.*, 2021) por lo que parece más probable que la variación observada en el estado de compactación y la oxidación de la cromatina de nuestras muestras se deba a esta influencia más que al envejecimiento de los verracos.

6. Conclusiones

1. El almacenamiento prolongado de las dosis de IA en refrigeración altera el estado de reducción de los puentes disulfuro de la cromatina espermática, pero no se produce un incremento de la oxidación de las bases nitrogenadas.
2. La estación en la que tiene lugar el eyaculado influye en el estado de reducción de los puentes disulfuro y la oxidación de las bases nitrogenadas de la cromatina espermática, presentando mayores niveles de ambos parámetros los eyaculados que ocurren en la estación cálida.

3. Para determinar la utilidad de estas pruebas para la industria porcina son necesarias nuevas investigaciones que estudien su relación con los valores de fertilidad de campo en las granjas.

7. Referencias

- Agarwal, A., Majzoub, A., Baskaran, S., Selvam, M. K. P. *et al.* (2020) “Sperm DNA fragmentation: a new guideline for clinicians”, *The world journal of men's health*, 38(4): 412.
- Agca, Y. (2020) “Assisted reproductive technologies and genetic modifications in rats”, en Suckow, M.A., Hankenson, F.C., Wilson, R.P. y Foley, P.L. (eds.) *The laboratory rat*. 2.^a ed. Columbia: Academic Press, pp. 181-213.
- Aitken, R. J. (2017) “Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage”, *Molecular reproduction and development*, 84(10), pp. 1039–1052.
- 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(2), pp. 1–10.
- 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.
- Alahmar, A. T., Singh, R. y Palani, A. (2022) “Sperm DNA fragmentation in reproductive medicine: a review”, *Journal of human reproductive sciences*, 15(3): 206.
- Al-Kass, Z., Ntallaris, T., Morrell, J. M. y Johannisson, A. (2023) “Deciphering sperm chromatin properties to predict stallion sperm fertility”, *Animal Reproduction Science*, 250: 107200.
- Andrabi, S. M. (2007) “Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation”, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(12), pp. 561–569.
- Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE) (2021) *ANICE – El Sector Cárnico Español*. Disponible en: https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico-espanol_171_1_ap.html (Accedido el 28 de mayo de 2023).
- Ausejo, R., Martínez, J. M., Soler-Llorens, P., Bolarín, A., *et al.* (2021) “Seasonal changes of nuclear DNA fragmentation in boar spermatozoa in Spain”, *Animals*, 11(2): 465.
- Barati, E., Nikzad, H. y Karimian, M. (2020) “Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management”, *Cellular and molecular life sciences*, 77, pp. 93-113.
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E. *et al.* (2017) “Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells”, *Molecular cell*, 66(1), pp. 89–101.
- Bielas, W., Nizański, W., Partyka, A., Rząsa, A. y Mordak, R. (2017) “Effect of long-term storage in safe cell+ extender on boar sperm DNA integrity and other key sperm parameters”, *Acta veterinaria scandinavica*, 59(1), pp. 1-12.
- BioRender (2022) *BioRender*. Disponible en: <https://biorender.com/> (Accedido: 20 de mayo de 2023).
- Boe-Hansen, G. B., Ersbøll, A. K., Greve, T. y Christensen, P. (2005) “Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity”, *Theriogenology*, 63(7), pp. 2006-2019.
- Bonet, S., Briz, M. D. y Yeste, M. (2012) “A proper assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also others focused on molecular markers of epididymal maturation”, *Reproduction in domestic animals*, 47, pp. 52–64.
- Bortolozzo, F. P., Menegat, M. B., Mellagi, A. P., Bernardi, M. L. y Wentz, I. (2015) “New artificial insemination technologies for swine”, *Reproduction in domestic animals*, 50, pp. 80–84.

- Broekhuijse, M. L., Šoštarić, E., Feitsma, H. y Gadella, B. M. (2012) “Relationship of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions”, *Journal of animal science*, 90(12), pp. 4327–4336.
- De Rosa, M., Johnson, S. A. y Opresko, P. L. (2021) “Roles for the 8-oxoguanine DNA repair system in protecting telomeres from oxidative stress”, *Frontiers in cell and developmental biology*, 9: 758402.
- 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.
- Dutta, S., Henkel, R. y Agarwal, A. (2021) “Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation”, *Andrologia*, 53(2): e13718.
- Esteves, S. C., Zini, A., Coward, R. M., Evenson, D. P. *et al.* (2021) “Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations”, *Andrologia*, 53(2): e13874.
- 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. P., Djira, G., Kasperson, K. y Christianson, J. (2020) “Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity”, *Fertility and sterility*, 114(2), pp. 311–320.
- Evenson, D.P. y Jost, L. (2000) "Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment", *Methods in cell science*, 22(2), pp. 169–189.
- Fraser, L., Strzeżek, J., Filipowicz, K., Mogielnicka-Brzozowska, M. y Zasiadczyk, L. (2016) “Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen”, *Theriogenology*, 86(3), pp. 806-816.
- Gadea, J. (2005) “Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility”, *Theriogenology*, 63(2), pp. 431–444.
- García-Vázquez, F. A., Mellagi, A. P. G., Ulguim, R. R., Hernández-Caravaca, I. *et al.* (2019) “Post-cervical artificial insemination in porcine: the technique that came to stay”, *Theriogenology*, 129, pp. 37–45.
- Hao, S. L., Ni, F. D. y Yang, W. X. (2019) “The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis”, *Gene*, 706, pp. 201–210.
- Interprofesional del Porcino de Capa Blanca Español (INTERPORC) (2021a) *El sector porcino, clave en la lucha contra la despoblación*. Disponible en: <https://interporc.com/2021/09/02/sector-porcino-clave-contra-la-despoblacion?cat=blog/el-ayer-y-hoy-del-cerdo> (Accedido el 28 de mayo de 2023).
- Interprofesional del Porcino de Capa Blanca Español (INTERPORC) (2021b) *El sector porcino como motor de la recuperación y transformación de la economía de España*. Disponible en: <https://interporc.com/2021/08/05/sector-porcino-motor-de-la-recuperacion-transformacion-economia-nacional?cat=blog/el-ayer-y-hoy-del-cerdo> (Accedido el 28 de mayo de 2023).
- Jung, M., Rüdiger, K. y Schulze, M. (2015) “In vitro measures for assessing boar semen fertility”, *Reproduction in domestic animals*, 50, pp. 20-24.
- Khezri, A., Narud, B., Stenseth, E. B., Johannisson, A. *et al.* (2019) “DNA methylation patterns vary in boar sperm cells with different levels of DNA fragmentation”, *BMC genomics*, 20, pp. 1-15.
- Knecht, D., Jankowska-Mąkosza, A. y Duziński, K. (2017) “The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity”, *Livestock science*, 201, pp. 13-21.
- Knox, R. V. (2014) “Impact of swine reproductive technologies on pig and global food production”, en Lamb, G.C. y DiLorenzo, N. (eds.) *Current and future reproductive technologies and world food production*. New York: Springer, pp. 131-160.
- Knox, R. V. (2016) “Artificial insemination in pigs today”, *Theriogenology*, 85(1), pp. 83–93.
- Koketsu, Y. y Sasaki, Y. (2009) “Boar culling and mortality in commercial swine breeding herds”, *Theriogenology*, 71(7), pp. 1186-1191.

- Koziorowska-Gilun, M., Koziorowski, M., Strzeżek, J. y Fraser, L. (2011) “Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract”, *Reproductive biology*, 11(1), pp. 37-47.
- Lacalle, E., Fernandez-Alegre, E., Soriano-Úbeda, C., Martinez-Martinez, S. *et al.* (2023) “Single layer centrifugation (SLC) for bacterial removal with Porcicoll positively modifies chromatin structure in boar spermatozoa”, *Theriogenology*, 201, pp. 95-105.
- Lewis, S. E. (2014) “Sperm DNA fragmentation and base oxidation”, en Baldi, E. y Muratori, M. (eds.) *Genetic damage in human spermatozoa*. New York: Springer, pp. 103-116
- Maside, C., Recuero, S., Salas-Huetos, A., Ribas-Maynou, J. y Yeste, M. (2023) “Animal board invited review: an update on the methods for semen quality evaluation in swine - from farm to the lab”, *Animal: an international journal of animal bioscience*, 17(3): 100720.
- Mellagi, A. P. G., Will, K. J., Quirino, M., Bustamante-Filho, I. C. *et al.* (2022) “Update on artificial insemination: semen, techniques, and sow fertility”, *Molecular reproduction and development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.23643>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (sin fecha) Sectores ganaderos. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/> (Accedido: 28 de mayo de 2023).
- Morrell, J. M. (2020) “Heat stress and bull fertility”, *Theriogenology*, 153, pp. 62-67.
- Moazamian, A., Gharagozloo, P., Aitken, R. J. y Drevet, J. R. (2022) “Oxidative stress and reproductive function: sperm telomeres, oxidative stress, and infertility”, *Reproduction*, 164(6), pp. 125-133.
- Muratori, M. y De Geyter, C. (2019) “Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men”, *Best practice and research clinical endocrinology and metabolism*, 33(1), pp. 117-126.
- Noblanc, A., Kocer, A. y Drevet, J. R. (2014) “Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge”, *Basic and clinical andrology*, 24(1), pp. 1-12.
- Ozkosem, B., Feinstein, S. I., Fisher, A. B. y O’Flaherty, C. (2015) “Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice”, *Redox biology*, 5, pp. 15–23.
- Paoli, D., Pecora, G., Pallotti, F., Faja, F. *et al.* (2019) “Cytological and molecular aspects of the ageing sperm”, *Human reproduction*, 34(2), pp. 218–227.
- Pérez-Cerezales, S., Martínez-Páramo, S., Cabrita, E., Martínez-Pastor, F. *et al.* (2009) “Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout”, *Theriogenology*, 71(4), pp. 605-613.
- Pesch, S. y Bergmann, M. (2006) “Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation”, *Micron*, 37(7), pp. 597–612.
- Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F. y Sánchez, R. S. (2019) “Preservation of boar semen: An update”, *Reproduction in domestic animals*, 54(3), pp. 423–434.
- Pezo, F., Yeste, M., Zambrano, F., Uribe, P. *et al.* (2021) “Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm”, *Cryobiology*, 98, pp. 5-11.
- R Core Team (2021) R: a language and environment for statistical computing (Versión 4.2.2) [Programa de ordenador]. Disponible en: <http://www.R-project.org/> (Accedido en: 12 de abril de 2023).
- Racewicz, P., Ludwiczak, A., Skrzypczak, E., Składanowska-Baryza, J. *et al.* (2021) “Welfare health and productivity in commercial pig herds”, *Animals*, 11(4): 1176.
- Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A. y Valojerdi, M. R. (2021) “Oxidation of sperm DNA and male infertility”, *Antioxidants*, 10(1): 97.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. y Renkawitz-Pohl, R. (2014) “Chromatin dynamics during spermiogenesis”, *Biochimica et biophysica acta-gene regulatory mechanisms*, 1839(3), pp. 155-168.

- Riesenbeck, A. (2011) "Review on international trade with boar semen", *Reproduction in domestic animals*, 46, pp. 1-3.
- Roca, J., Broekhuijse, M. L. W. J., Parrilla, I., Rodriguez-Martinez, H. *et al.* (2015) "Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized?" *Reproduction in domestic animals*, 50, pp. 48-55.
- Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Cuello, C. *et al.* (2006) "Challenges in pig artificial insemination", *Reproduction in domestic animals*, 41, pp. 43-53.
- Rodríguez-Gil, J. E. y Estrada, E. (2013) "Artificial insemination in boar reproduction", en Bonet, S., Casas, I., Holt, V.W. y Yeste, M. (eds.) *Boar reproduction*. Heidelberg: Springer, pp. 589-607.
- Savić, R., Ausejo, R., Petrović, M., Radojković, D. *et al.* (2017) "Fertility of boars - what is important to know", *Biotechnology in animal husbandry*, 33, pp. 135-149.
- Shahat, A. M., Rizzoto, G. y Kastelic, J. P. (2020) "Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality", *Theriogenology*, 158, pp. 84-96.
- Soria-Meneses, P. J., Jurado-Campos, A., Montoro, V., Soler, A. J. *et al.* (2019) "Ovine sperm DNA oxidation quantification using an 8-OHdG immunodetection assay", *Reproduction in domestic animals*, 54, pp. 59-64.
- 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.
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F. y Johnson, L. (2019) "Application of preserved boar semen for artificial insemination: past, present and future challenges", *Theriogenology*, 137, pp. 2-7.
- Winther, J. R. y Thorpe, C. (2014) "Quantification of thiols and disulfides", *Biochimica et biophysica acta*, 1840(2), pp. 838-846.
- Zasiadczyk, L., Fraser, L., Kordan, W. y Wasilewska, K. (2015) "Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates", *Theriogenology*, 83(8), pp. 1287-1303.
- Zubkova, E. V., Wade, M. y Robaire, B. (2005) "Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging", *Fertility and sterility*, 84, pp. 1191-1198.