



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EVALUACIÓN DE LA HISTONA 3 Y DOS DE
SUS ALTERACIONES EPIGENÉTICAS MÁS
COMUNES (H3K27ACETYL Y H3K27ME3)
MEDIANTE INMUNOMARCAJE EN UN
MODELO PORCINO**

**EVALUATION OF THE HISTONE 3 AND TWO
OF ITS MOST COMMON EPIGENETIC
ALTERATIONS (H3K27ACETYL AND
H3K27ME3) THROUGH INMUNOLABELING
IN A PORCINE MODEL**

Diego Alonso Campo

Felipe Martínez Pastor, Estíbaliz Lacalle Fernández

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2023

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de este trabajo, fuese de la forma que fuese. Especialmente, me gustaría agradecer a mi tutor, Felipe Martínez Pastor, así como a mi cotutora, Estíbaliz Lacalle Fernández, por toda la ayuda, orientación y paciencia brindada durante el proyecto.

También me gustaría agradecer a mis amigas y compañeras, Lorena, Marina y María, por todo el apoyo, fuerzas y cariño que me han dado durante este tiempo; y a las dos personas más importantes para mí durante estos cuatro años, Fer y Iago. Sin vosotros no lo habría logrado.

Muchas gracias

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR PORCINO.....	1
1.2 REPRODUCCIÓN PORCINA EN LA INDUSTRIA.....	2
1.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN VERRACO.....	4
1.4 ESPERMATOGÉNESIS Y CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO.....	5
1.5 RELACIÓN ENTRE LAS HISTONAS Y LA FERTILIDAD.....	8
2. ONJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
3.1 EQUIPO Y MATERIAL.....	9
3.2 REACTIVOS Y MEDIOS.....	10
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	11
3.3.1 Preparación de las muestras para el análisis mediante citometría...12	
3.3.2 Detección de H3 y sus alteraciones epigenéticas H3K27acetyl y H3K27me3 mediante citometría de flujo.....	14
3.3.3 Análisis estadístico.....	17
4. RESULTADOS.....	17
4.1 RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE LA H3.....	17
4.2 RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE H3K27ac.....	20
4.3 RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE H3K27me3.....	22
4.4 SUBPOBLACIONES DE ACETILACIÓN Y TRIMETILACIÓN.....	22
5. DISCUSIÓN.....	24
6. CONCLUSIONES.....	28
7. REFERENCIAS.....	29

RESUMEN

Uno de los retos más importantes a los que se enfrenta el sector porcino es la detección de verracos de fertilidad subóptima para la cría. Las técnicas de análisis espermático porcino utilizadas hoy en día presentan limitaciones a la hora de evaluar su idoneidad para la inseminación de cerdas, por lo que nuevas técnicas deben estudiarse para mejorar esta situación. En el presente estudio se llevó a cabo la evaluación de muestras espermáticas procedentes de un grupo de verracos en distintas recogidas a lo largo del año mediante un protocolo de identificación tanto de la H3 total como de dos de sus modificaciones postraduccionales más importantes: su acetilación y trimetilación. Este análisis fue llevado a cabo mediante la técnica de citometría de flujo. La cantidad de histonas presentes en la cromatina espermática es un indicador del nivel de compactación de esta, mientras que la acetilación suele estar relacionada con la activación de la transcripción y la trimetilación con la represión de esta.

En base a los resultados obtenidos, se puede observar que el contenido en la H3 y sus variantes se reduce a lo largo del tiempo, lo que podría generar una cromatina más compacta. Por otro lado, los niveles de acetilación también se reducen, mientras que los de trimetilación aumentan. Se trata de unos resultados muy interesantes y prometedores. Sin embargo, todavía es necesario comparar estos datos con los de fertilidad proporcionados por el centro de investigación para poder establecer nuevas conclusiones.

Palabras clave: cromatina, espermatozoide porcino, H3, H3K27acetyl, H3K27me3, verraco.

Abstract

One of the most important challenges faced by the porcine sector is the detection of boars with suboptimal fertility for breeding. The analysis techniques of porcine sperm used today have limitations when evaluating their suitability to inseminate sows, so new techniques must be studied to improve this situation. In the present study, the evaluation of sperm samples from a group of boars collected at different times of the year were evaluated using a protocol to identify both total H3 and two of its most important post-translational modifications: acetylation and trimethylation. This analysis was carried out by flow cytometry. The amount of histones present in sperm chromatin is an indicator of the level of sperm chromatin compaction, whereas acetylation is usually related to transcription activation and trimethylation to transcription repression.

Based on the results obtained, it can be observed that the content in H3 and its variants is reduced over time, generating a more compact chromatin. Moreover, the levels of acetylation also decrease, while those of trimethylation increase. These are very interesting and promising results. However, it is still necessary to compare these data with the fertility data provided by the research center in order to draw new conclusions.

Keywords: chromatin, boar sperm, H3, H3K27acetyl, H3K27me3, boar.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de la inseminación artificial (IA) como método para la reproducción porcina comenzó a extenderse en la década de 1960. Hoy en día, la eficiencia y ganancias de la producción comercial están completamente vinculadas al uso de la IA, siendo usada en prácticamente la totalidad de los casos, quedando la reproducción por monta natural relegada a casos puntuales. Este uso de la IA supone enormes ventajas con respecto a la monta natural, mejorando la eficiencia del proceso, la salud de los reproductores y genética de la descendencia (Knox, 2016).

Debido a esto, antes de usar un verraco para reproducción, es muy importante saber qué nivel de fertilidad tiene, ya que su semen preservado se va a utilizar para inseminar cientos de hembras (Rodríguez-Martínez, 2005). Las técnicas rutinarias utilizadas en las granjas, basadas en el número de espermatozoides, la motilidad o morfología, entre otras, se han utilizado tradicionalmente para identificar deficiencias evidentes de fertilidad, pero otras características que merman la fertilidad de los espermatozoides pueden pasar desapercibidas. Por tanto, es necesario el desarrollo de distintas técnicas avanzadas que permitan la detección de verracos subfértiles, como aquellas que analizan distintos parámetros de la cromatina espermática (Roca *et al.*, 2016).

1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR PORCINO

En España, el sector porcino tiene una importancia económica enorme, ya que supone en torno al 14% de la Producción Final Agraria. Además, dentro de las producciones ganaderas, el sector porcino ocupa el primer lugar en cuanto a importancia económica, alcanzando cerca del 39% de la Producción Final Ganadera (MAPA, 2023). En cuanto a valores del PIB, este sector supone cerca del 2% del PIB nacional y del 9,5% del PIB industrial. Se estima, además, que genera unos 300.000 empleos directos y hasta un millón de indirectos (INTERPORC, 2021).

A nivel mundial, España es la cuarta potencia productora de porcino (después de China, EE. UU., y Alemania), mientras que, a nivel europeo, España ocupa el segundo lugar en producción, con un 19% de las toneladas producidas, únicamente por detrás de Alemania, y es el primer país de la UE en censo, con cerca del 21% del censo comunitario,

(MAPA, 2023). Sumado a esto, en 2022, la carne de cerdo siguió siendo, con gran diferencia, el principal producto cárnico exportado de la Unión Europea, a pesar de un descenso interanual. Esto refleja la importancia de este sector para la economía (3tres3, 2022).

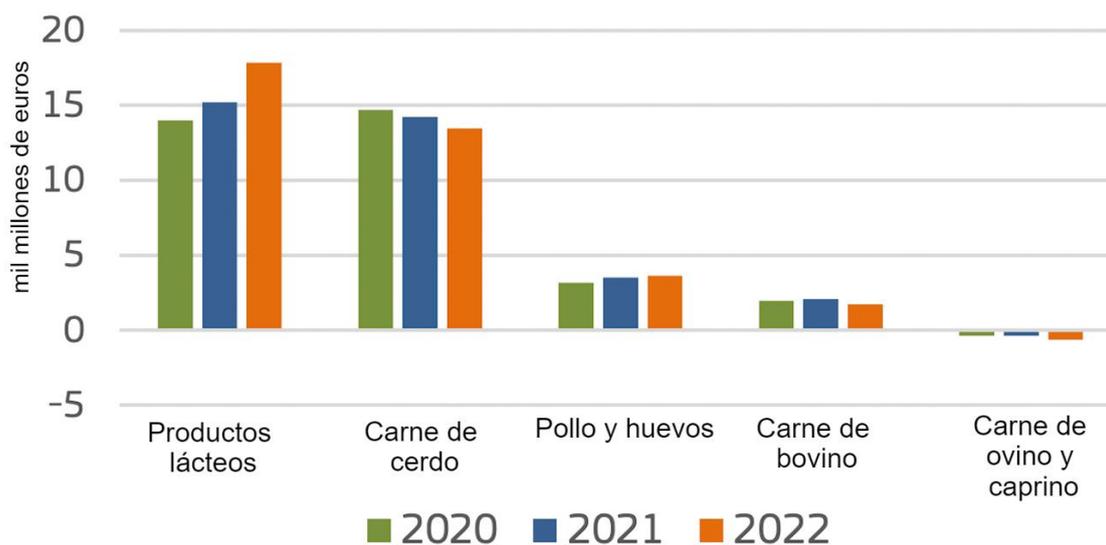


Figura 1. Exportaciones netas de productos de origen animal de la UE entre 2020 y 2022. Fuente: 3tres3, 2022.

Cabe destacar que este notable crecimiento del sector se debe, en gran parte, a la epidemia de gripe porcina sufrida por el ganado chino en 2018, la cual disparó la demanda de cerdo español en el país asiático. En 2020 y 2021, las ventas llegaron a crecer un 111% y un 30% respectivamente, y en los próximos años se espera que el sector siga expandiéndose, aunque a un ritmo mucho más moderado (Cinco Días, 2021).

Por tanto, todo lo visto hasta ahora refleja la gran importancia económica que tiene este sector, no solo para España, sino también para toda la Unión Europea.

1.2 REPRODUCCIÓN PORCINA EN LA INDUSTRIA

En la actualidad, los casos de reproducción porcina mediante monta natural son meramente anecdóticos, quedando solo en pequeñas granjas familiares. En producción industrial, la técnica de referencia es la IA con semen fresco refrigerado a partir de dosis producidas en centros de selección de verracos de alto valor genético (Waberski *et al.*, 2019).

El uso de la IA como método para la reproducción porcina comenzó a extenderse en la década de 1960, principalmente en la Unión Europea. En torno a 1980, en algunos países europeos este método ya era utilizado en el 50-75% de los casos y, en el año 2000, se estima que en la mayoría de países, la totalidad de la reproducción porcina industrial era llevada a cabo por medio de IA. Hoy en día, la eficiencia y ganancias de la producción comercial están completamente vinculadas al uso de esta técnica (Knox, 2016).

El monopolio establecido por parte de este método en la reproducción porcina se debe a que presenta un gran número de ventajas sobre la monta natural. En primer lugar, el procesamiento del semen para la IA requiere la dilución del semen puro con distintos diluyentes, generando una reducción de la concentración de plasma seminal (Höfner *et al.*, 2020). Esto supone una ventaja, ya que la dilución del semen con diluyentes permite la obtención de múltiples dosis de IA a partir de un solo eyaculado, pudiendo inseminar de 10 a 20 hembras con él. Asimismo, la refrigeración de los espermatozoides en suspensión en estos diluyentes permite la extensión de la vida útil de las dosis hasta 3-5 días, con el consecuente ahorro económico (Pezo *et al.*, 2019).

Los programas de mejora genética fueron diseñados para aprovechar las ventajas de la heterosis, es decir, la crianza y mejoramiento selectivo. Estos sistemas se basan en mantener la integridad de los rasgos de la raza pura y llevar a cabo procesos de selección para conseguir la distribución de esos genes a lo largo de la descendencia. El uso de la IA para la reproducción ha permitido acelerar enormemente esta mejora genética deseada (Knox, 2016).

Además, otra de las grandes ventajas de la IA porcina es que permite reducir la transmisión de enfermedades venéreas en las granjas reproductoras. Aunque la mayoría de los virus y bacterias no son patógenos, algunos pueden generar graves problemas si se produce infección, pudiendo dar lugar a problemas asociados con daños en el espermatozoide, fracaso de la gestación, aborto o endometritis, entre otros problemas. Se ha demostrado que varios virus se transmiten en el semen de los cerdos, por lo que su detección es fundamental. La IA abre la posibilidad a este control, generándose centros de IA libres de patógenos, garantizando un alto nivel sanitario gracias al uso de esta técnica. Además, otras muchas enfermedades se transmiten por contacto directo entre cerdos, evitándose con el uso de IA (Knox, 2016).

Por lo tanto, se puede concluir que la IA es una técnica fundamental en la industria porcina actual, permitiendo aumentar enormemente la eficiencia de producción gracias al gran número de hembras que se pueden inseminar con un único eyaculado y a la selección de aquellos machos óptimos para su uso en reproducción. El proceso de selección de los mejores machos se explicará en el siguiente apartado.

1.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL EN VERRACO

Antes de usar un verraco para la inseminación de varias hembras, es muy importante conocer si este es fértil, y su nivel de fertilidad. Esto es especialmente relevante cuando el verraco va a ser usado en programas de IA, donde un alto número de hembras serán inseminadas con su semen preservado. Por ende, la evaluación de su aptitud reproductiva y de la calidad de su semen, antes y después de su manejo para IA, son de primordial importancia para prevenir caídas en la eficiencia reproductiva de la ganadería porcina (Rodríguez-Martínez, 2005).

Por tanto, en la industria porcina es de gran interés poder evaluar el semen de una manera rápida y repetible para poder detectar qué machos producen semen con unos estándares de calidad que aseguren un alto nivel productivo. En los propios centros de inseminación, de rutina se examina el color, viscosidad y el aspecto general del eyaculado, así como la concentración, morfología y motilidad espermáticas (Rodríguez-Martínez, 2005).

El color, por lo general, se encuentra entre gris y blanco grisáceo. En cuanto a la concentración espermática, puede ser determinada mediante fotometría, sin embargo, esto tiene un alto margen de error, por lo que se deben hacer recuentos manuales utilizando cámaras de recuento en microscopía, siendo especialmente usada en espermatología la cámara Bürker. La cantidad total de espermatozoides por eyaculado es un parámetro importante, ya que refleja indirectamente la capacidad de producción gonadal y de almacenamiento en las reservas no-gonadales del reproductor. Por otro lado, para el análisis de la movilidad, existen *softwares* específicos que permiten su determinación directa, como el sistema CASA (*Computer Asisted Sperm Analysis System*), que permiten determinar el número y porcentaje de células estáticas y las que están en movimiento, clasificando además los espermatozoides en lentos, medios y rápidos según su velocidad, permitiendo además obtener otros datos individuales de cada espermatozoide como la

velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), así como otros índices tales como el índice de linealidad (LIN) o la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), entre otros. Por último, la evaluación de morfología incluye la localización de anomalías presentes en las distintas partes del espermatozoide: cabeza, pieza intermedia y cola (Rodríguez-Martínez, 2005).

Estas técnicas rutinarias, previamente descritas, utilizadas en las granjas, sirven para identificar defectos observables que pueden influir en la fertilidad, pero otras características que merman la fertilidad de los espermatozoides pueden pasar desapercibidas (Roca *et al.*, 2016). Por tanto, muchos machos subfértiles, aquellos cuyas tasas productivas son ligeramente inferiores a las de los machos fértiles, normalmente pasan desapercibidos a las técnicas rutinarias de evaluación de semen.

El mantenimiento de estos animales en producción disminuye enormemente la eficiencia reproductiva de las granjas (Roca *et al.*, 2015). Esta imposibilidad de cubrir los estándares productivos de los ganaderos supone cientos de miles o incluso millones de euros en compensaciones. Esta situación es incluso más grave cuando se utilizan técnicas de IA (Schulze *et al.*, 2019), ya que el semen de cada macho subfértil puede utilizarse para inseminar a cientos de hembras. Se ha estimado que la detección temprana y eliminación del 10% de los verracos de menor fertilidad provocaría un aumento de producción de 2,2 lechones/cerda, lo que supondría un aumento de los ingresos de más de 10.000 €/año para una granja de 1.000 cerdas (Roca *et al.*, 2015).

Por tanto, es necesario el desarrollo de distintas técnicas avanzadas que permitan la detección de verracos subfértiles. En los últimos años se están desarrollando varias técnicas que permiten el estudio de la estructura de la cromatina de la cabeza del espermatozoide, como factor que pueda predecir la calidad espermática de los verracos (Roca *et al.*, 2016).

1.4 ESPERMATOGÉNESIS Y CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE PORCINO

La espermatogénesis es un proceso fisiológico muy complejo mediante el cual tiene lugar la formación de las células germinales masculinas haploides. Este proceso puede dividirse en tres fases sucesivas: mitosis, meiosis y, por último, espermiogénesis (Le

Blévec *et al.*, 2020). Durante esta última etapa, las espermátidas experimentan grandes cambios morfológicos, así como remodelación nuclear, para dar lugar a células estructuralmente distintas, los espermatozoides. Este proceso tiene lugar en los túbulos seminíferos de los testículos (Patankar y Parte, 2017).

El material genético contenido en las células de los organismos eucariontes se encuentra estrechamente asociado a proteínas. Dicho complejo nucleoprotéico recibe el nombre de cromatina y es clave para el mantenimiento de la estructura del ADN, así como en la regulación de la expresión génica (Li y Fang, 2015). La cromatina de los espermatozoides de mamíferos, a diferencia de la de las células somáticas, no posee como principal tipo de proteínas histonas, sino protaminas (Dogan *et al.*, 2015). Las protaminas son nucleoproteínas ricas en arginina y cisteína, de pequeño tamaño, básicas y muy abundantes en los espermatozoides. Se sintetizan en la última fase de la espermatogénesis y participan en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares durante la maduración en el epidídimo (Patankar y Parte, 2017). Existen tres tipos de protaminas: protamina 1 (P1), protamina 2 (P2) y protamina 3 (P3), aunque solo las dos primeras participan en la compactación del ADN espermático (Le Blévec *et al.*, 2020).

Durante la espermatogénesis, tiene lugar un proceso conocido como protaminación. Este proceso produce la degradación del 85-95% de las histonas mediante el sistema ubiquitín-proteasoma, provocando la sustitución de histonas por protaminas en los gametos masculinos. Todo esto genera una compactación del ADN unas seis veces mayor, ayudando a la protección del material genético espermático frente a factores de estrés extracelulares y dotando al núcleo de un menor tamaño (Wang *et al.*, 2019).

Durante este proceso, se produce la transición de nucleohistona a nucleoprotamina. Esta transición no es directa, sino un proceso gradual, pero que ocurre más o menos simultáneamente y en el que se produce la sustitución de histonas somáticas por variantes específicas de testículo y, estas a su vez por proteínas de transición, para acabar dando lugar a protaminas (Patankar y Parte, 2017).

Como se ha mencionado, las histonas canónicas sufren modificaciones postraduccionales (PTMs), siendo sustituidas por variantes específicas de testículo. Se han descrito variantes testiculares de las histonas canónicas H2A, H2B, H3 y H4, así como de la histona enlazadora H1. Cada variante de histona tiene su propio patrón de expresión, el cual está directamente relacionado con su función específica durante el

proceso de transición de histona a protamina. Estas modificaciones inducen inestabilidad en la cromatina, lo que favorece el desensamble de los nucleosomas y la posterior asociación del ADN con proteínas de transición y protaminas (Le Blévec *et al.*, 2020).

Tras esto, y siguiendo con la protaminación, estas histonas modificadas son sustituidas por proteínas de transición (PT). En los mamíferos, como roedores, humanos, ovinos y suínos, predominan dos tipos de proteínas de transición: la proteína de transición 1 (TP1) y la proteína de transición 2 (TP2) (Patankar y Parte, 2017). Estas PT son de carácter más básico que las histonas, pero menor que las protaminas, y son imprescindibles para el correcto desarrollo de la espermatogénesis.

Por último, estas PT se reemplazan por protaminas. No obstante, este proceso no ocurre en dos etapas bien diferenciadas (paso de histonas a PT y, de estas, a protaminas), contrariamente a lo que se creía, sino que se trata de un proceso mucho más complejo (Le Blévec *et al.*, 2020). Este proceso, de forma muy esquemática, se puede apreciar en la Figura 2.

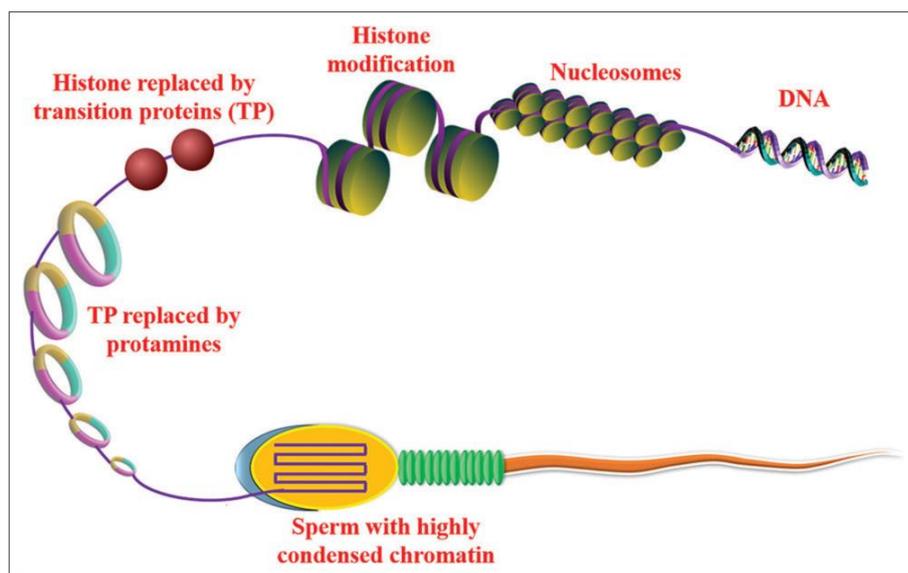


Figura 2. Esquema representativo sobre las distintas etapas que tienen lugar durante el proceso de protaminación, pasando de un material genético asociado a histonas a uno asociado a protaminas y con un nivel de compactación mucho mayor. Fuente: Kamaraj *et al.*, 2022.

Sin embargo, no todas las histonas son reemplazadas por protaminas, sino que un pequeño porcentaje permanece en la cromatina espermática. De esta forma, en aquellos lugares donde se encuentre un porcentaje excesivo de estas histonas, la cromatina se

encontrará menos compactada, produciendo una situación poco deseable que disminuye la calidad espermática (Le Blévec *et al.*, 2020).

1.5 RELACIÓN ENTRE LAS HISTONAS Y LA FERTILIDAD

Durante la espermiogénesis, la mayor parte de las histonas son sustituidas por protaminas, generando una cromatina con un nivel de compactación muy superior. Este proceso es crucial, ya que una sustitución incorrecta de estas histonas está relacionada con una menor fertilidad (Kutchy *et al.*, 2018).

Las histonas restantes, es decir, las que no se reemplazaron por protaminas durante la espermiogénesis, no presentan una distribución aleatoria, sino que se encuentran en localizaciones importantes para el desarrollo embrionario. Estas histonas sufren diversas PTMs, las cuales les permiten regular la expresión génica, así como actuar como etiquetas epigenéticas, transmitiéndose estas a la descendencia (Kutchy *et al.*, 2018).

El “código histónico” es una hipótesis formulada por Jenuwein & Allis (2001), que establece que las histonas y sus modificaciones postraduccionales regulan la información epigenética. Desde entonces, se ha investigado mucho sobre la función epigenética de las histonas, relacionándolo con la fertilidad masculina. Un ejemplo de esto es la histona 3.3, una variante que difiere de la histona 3 canónica en cinco aminoácidos, la cual aumenta la actividad de los promotores de genes activos (Chow *et al.*, 2005). Entre las PTMs más comunes que permiten a las histonas regular la expresión génica se encuentran la acetilación y la metilación (Kutchy *et al.*, 2018).

Por un lado, se sabe que la acetilación de la lisina afecta a la cromatina, disminuyendo la carga positiva de las histonas, lo que provoca una interacción débil entre las histonas y el ADN, cargado negativamente, aumentando la fluidez de la cromatina (Bao y Bedford, 2016). Por otro lado, las metiltransferasas catalizan la metilación de la lisina en las histonas. Estas PTMs de las histonas canónicas pueden afectar a la accesibilidad del genoma masculino a los factores de transcripción maternos durante el desarrollo embrionario (Miller, Brinkworth, & Iles, 2010).

Una mayor infertilidad está relacionada con una mayor fracción de espermatozoides que retienen anormalmente un exceso de histonas (Hammoud *et al.*, 2011). Además, algunos autores proponen que cualquier defecto que se produzca en la

sustitución histona-protamina puede conducir a una baja fertilidad. Por tanto, es de gran interés el estudio de estas modificaciones postraduccionales en las histonas y cómo pueden afectar a la fertilidad. Es de especial interés el estudio de la histona 3 (H3), ya que se sabe que tanto la acetilación de la lisina 27 de esta histona 3 (H3K27acetyl), como la trimetilación de esta lisina (H3K27me3), están relacionados con la activación y represión, respectivamente, de la expresión génica. Se sabe que la acetilación en las histonas siempre produce activación, mientras que las metilaciones dependen del número de grupos metil y de la posición concreta del aminoácido en la que ocurre dicha modificación en la histona (Kutchy *et al.*, 2018).

Sumado a todo esto, la H3 es también una gran opción de estudio debido a que se encuentra muy conservada entre especies. En el estudio realizado por Kutchy *et al.* (2018), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, así como una matriz de porcentaje de identidad entre la proteína H3 y el transcrito H3, y se observó una conservación de H3 entre los mamíferos analizados del 96.32%-100%.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado fue evaluar el estado de la histona 3 en espermatozoides de varios verracos de un centro de inseminación a los que se les fue haciendo un seguimiento desde su entrada al centro. En concreto se evaluó la presencia de la histona 3 total, así como de dos de las alteraciones epigenéticas más frecuentes en esta histona: H3K27acetyl y H3K27me3, usando citometría de flujo para estudiar cómo varían estas señales entre los diferentes verracos a lo largo de su vida, así como el efecto que la conservación genera en estas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EQUIPO Y MATERIAL

Los materiales utilizados, así como los equipos empleados, para llevar a cabo el análisis de la H3, H3K27acetyl y H3K27me3 por medio de citometría de flujo, fueron los siguientes:

- Placas de 96 pocillos con fondo en “U”.
- Guantes.

- Micropipetas, capaces de mover volúmenes desde 10 μ l a 1000 μ l.
- Puntas de micropipeta.
- Micropipeta multicanal.
- Pipeta de repetición.
- Balancín.
- Cajas de poliestirén (con y sin hielo).
- Estufa, configurada para una temperatura de 37 °C.
- Baño de agua a 37 °C.
- Gradillas.
- Tubos de citometría.
- Citómetro de flujo.
- Centrífuga para placas. La centrífuga se encontraba configurada bajo las siguientes condiciones:
 - o 4 °C como temperatura de funcionamiento.
 - o 11 minutos de funcionamiento.
 - o 1000 \times g.

3.2 REACTIVOS Y MEDIOS

En cuanto a los reactivos usados para llevar a cabo el protocolo y análisis, se encuentran los siguientes:

- Solución TNE para el mantenimiento de la estructura de la cromatina espermática; compuesta de Tris-HCl 0,01 M (Sigma T5941), NaCl 0,15 M (Sigma S9625) y EDTA 1 mM (Sigma E1644).
- PBS (Solución salina tamponada con fosfato), compuesta por NaCl 137 mM (Sigma S9625), KCl 2,7 mM (Sigma P5405), Na₂HPO₄ 8 mM (Sigma S5136) y KH₂PO₄ 2 mM (Sigma P5655). Para el ajuste del pH a 7,4 se usa HCl (Sigma H1758) y NaOH (Sigma S8045).
- PBS-PFA 4% (Paraformaldehído): solución de fijación; preparación de solución de trabajo a partir de stock 37 % (Fisher Scientific BP531-25).
- PBS-BSA 0,5% (Albúmina sérica bovina, Sigma-Aldrich, A7906): solución de bloqueo.

- Tritón 0,1% en citrato 0,1%, solución de permeabilización: solución de permeabilización; preparación de la solución a partir de Tritón X-100 (Sigma T9284) y citrato de sodio tribásico dihidratado ($C_6H_9Na_3O_9$; Sigma, 71402).
- DTT 20 mM (1,4-Ditiotreitol): solución de descondensación; a partir de stock 1 M (ACROS ORGANICS, 426380500).
- Anticuerpos primarios anti H3 rabbit (abcam, ab176842), anti H3K27acetyl rabbit (abcam, ab177178) y anti H3K27me3 mouse (abcam, ab6002).
- Anticuerpos secundarios: Alexa 488 anti-rabbit (abcam, ab150081) y Alexa 594 anti-mouse (abcam, ab150120).
- Hoechst 33342 (H342, Sigma B2261): tinción de marcaje de los núcleos celulares; preparación de la solución de trabajo ($2,67\mu M$ en PBS) a partir de una solución stock a 1,78 mM en agua deionizada.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio fue llevado a cabo en el Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) de la Universidad de León. Dentro de este Instituto, el proyecto fue llevado a cabo por el grupo REPROBIO (*Research on biology of reproduction and related biotechnologies in the University of León*). Las muestras seminales estudiadas fueron producidas y donadas por el centro de inseminación AIM Ibérica (Campo de Villavidel, León, España).

Este trabajo forma parte de un proyecto de un año y medio que busca evaluar los verracos que ingresan en un centro de inseminación durante toda su vida reproductiva. En este proyecto se partía de un número inicial de 37 verracos, de los cuales se llevaron a cabo seis recogidas. La primera de las recogidas se realizó en enero de 2022, teniendo lugar en abril, julio y octubre de ese mismo año la segunda, tercera y cuarta, respectivamente. La quinta y sexta recogidas se realizaron en enero y junio de este mismo año 2023, respectivamente. Sin embargo, los 37 individuos no llegaron todos al final del proyecto, ya que algunos se iban eliminando a lo largo de los meses, quedando en la sexta recogida únicamente 11 individuos. No obstante, se introdujeron nuevos verracos a mitad de proceso para suplir estas bajas. En cada período se recogieron varios eyaculados en semanas consecutivas, utilizándose dos de estos (duplicado del macho) en este trabajo.

Las dosis obtenidas de cada macho eran recogidas del centro de inseminación a primera hora. Al llegar al laboratorio, el volumen de cada muestra espermática se dividía en dos tubos. Uno de ellos se utilizaba para el mantenimiento de las muestras refrigeradas a 17 °C. El otro tubo con la mitad del volumen se diluyó en solución TNE según llegaban las muestras al laboratorio, para mantener la estructura de la cromatina espermática, y se congeló inmediatamente a -80 °C; este día fue considerado como día 0 de almacenamiento (D0). El resto del volumen de dosis seminales se mantuvo a 17 °C, como se ha mencionado anteriormente, durante 11 días (D11) y, pasado este tiempo, se diluyó el volumen necesario de muestra seminal en medio TNE, para también ser congelado a -80 °C.

Este almacenamiento durante 11 días a 17 °C se realizó para poder comprobar si el almacenamiento de estas muestras seminales puede afectar a la estructura de la cromatina.

Para este trabajo, se han analizado y evaluado las muestras de los verracos obtenidas en la primera recogida (enero 2022) y los de la tercera recogida (julio 2022), para comparar qué ha ocurrido durante esos más de 6 meses o si la estación también puede influir. En total, se han analizado 11 machos, que son los comunes a ambas recogidas.

3.3.1 Preparación de las muestras para el análisis mediante citometría.

En primer lugar, se descongelaron las muestras a analizar, tanto los estándares como las experimentales, en un baño a 37 °C hasta que desaparecía el hielo, oscilando este tiempo entre 30 segundos – 1 minuto, en función del volumen de muestra en el tubo (500 µl – 1 ml). En cada uno de los pocillos, se alicuotaba un volumen de muestra de 250 µl (según concentración inicial, asumimos aprox. 20×10^6 /ml). El estándar era un *pool* formado por muestras de varios machos que actúa como control. Este estándar se usaba para compensar las variaciones entre placas analizadas en diferentes días, ya que se supone que deberíamos obtener el mismo resultado, por lo que se puede ajustar el citómetro y luego los análisis para que estos resultados sean los mismos.

Una vez pipeteadas las muestras en la placa, esta se llevaba a la centrífuga y se centrifugaba en las condiciones indicadas en el apartado de equipo y materiales: 4 °C de temperatura y 1000 x g de velocidad durante un total de 11 minutos.

Tras la centrifugación, se eliminaba el sobrenadante de los pocillos, volcando la placa sobre papel, y se resuspendía el pellet en 150 µl de PBS-PFA 4% para evitar la autólisis, y

mantener las características de las células. Las muestras se mantuvieron 20 minutos en el balancín dentro de una caja de poliespán con hielo, para mantener las células en frío mientras se llevaba a cabo la fijación.

Tras esto se llevaba a cabo un lavado añadiendo 100 µl de PBS-BSA 0,5% en cada uno de los pocillos con una pipeta de repetición. Posteriormente, se llevaba la placa a centrifugar de nuevo, en las mismas condiciones que en la anterior centrifugación y, tras ella, se volvía a volcar la placa para eliminar el sobrenadante.

A continuación, se resuspendía el pellet en 150 µl de solución de permeabilización. Se usa el Tritón combinado con citrato ya que se ha demostrado que el citrato también puede ser un gran permeabilizador y ayudar a la acción del Tritón (Helander *et al*, 2000). Una vez añadida la solución, se mantienen las muestras durante 30 minutos, dentro de la caja de poliespán con hielo. Pasado este tiempo, se lleva a cabo otro lavado con su correspondiente centrifugación a las condiciones anteriormente descritas.

A continuación, se resuspendía el pellet en 150 µl de DTT 20 mM, y se dejaba incubar quince minutos en una estufa 37 °C. Pasado este cuarto de hora, se lleva a cabo otro lavado.

Tras esto, se añadió el anticuerpo primario, añadiendo en cada pocillo 200 µl del anticuerpo primario correspondiente: H3 (dilución 1/200 en PBS-BSA 0,5%), H3K27acetyl (dilución 1/1000 en PBS-BSA 0,5%) y H3K27me3 (dilución 1/200 en PBS-BSA 0,5%) y dejándolo incubar *overnight* a 4 °C.

Al día siguiente, se realizan dos lavados para eliminar los restos de anticuerpo primario que hayan podido quedar en suspensión. Una vez realizados los dos lavados, se añade el anticuerpo secundario, poniendo también 200 µl del anticuerpo secundario correspondiente: Alexa 488 anti-rabbit (dilución 1/400 en PBS-BSA 0,5%) y Alexa 594 anti-mouse (dilución 1/400 en PBS-BSA 0,5%). La incubación de las células con los secundarios se llevó a cabo durante una hora y cuarto a temperatura ambiente en balancín. Posteriormente, se realizaron otros dos lavados para eliminar los restos de secundario que pudiesen quedar en suspensión.

Finalmente, se resuspendió el pellet en 250 µl de solución de tinción usando H342 para marcar núcleos celulares y así poder seleccionar los espermatozoides al analizar la placa por citometría de flujo.

3.3.2 Detección de H3 y sus alteraciones epigenéticas H3K27 acetyl y H3K27me3 mediante citometría de flujo

El análisis de la señal de la H3 y de las dos alteraciones epigenéticas que se evaluaron en este trabajo se realizaron por separado. Es decir, cada muestra se analizó por duplicado para evaluar por un lado la señal de H3 y, por otro lado, la señal conjunta H3K27acetyl y H3K27me3 que presentaba cada muestra. El instrumento utilizado para esto es el citómetro CytoFLEX (Beckman Coulter, California, EEUU).

En primer lugar, se comprobó el flujo del paso de los fluorocromos a través del citómetro, para asegurarnos que se tratase de un flujo estable en el tiempo y que no hubiese saltos y cortes, de modo que los resultados sean fiables, mostrando como ejemplo el flujo del paso del fluorocromo H342 y el Alexa 488 a través del tiempo (Figura 3a y 3b, respectivamente).

En todos los casos, para realizar el análisis por citometría de flujo es necesario identificar y eliminar los agregados celulares o “dobletes” mediante la región que denominamos “cell aggregates exclusión” usando el Forward Scatter enfrentando altura y área (FSC-A vs. FSC-H; Figura 4a) y filtrar a partir de aquí el resto de citogramas. El siguiente citograma que sería necesario es el Forward and Side Scatter (FSC vs. SSC) para la identificación de la población de espermatozoides según lo que considera el citómetro, en función del tamaño y complejidad (nombrado como “sperm”; Figura 4b). Como segundo criterio para comprobar que se trata de espermatozoides, se realizó otro citograma utilizando H342 (SSC-H342; Figura 4c) para teñir los núcleos celulares, que es la región denominada como “nuclei”. A partir de aquí, el resto de citogramas se filtraron a partir de estos tres que acaban de ser descritos.

La evaluación de todas las señales se realizó para el total de células (obtenidas a partir de las regiones “sperm”+“nuclei”, filtradas por el citograma “cell aggregates exclusión”). La H3 se detectó con un anticuerpo secundario Alexa 488, utilizando el láser azul para excitación y un filtro 525/40 para emisión (Figura 5a). Para la detección de H3K27acetyl y H3K27me3 se usaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 y Alexa 594, respectivamente. El primero de ellos se excita con el láser azul y usa un filtro 525/40 de detección, mientras que en el caso del Alexa 594 se excita con el láser amarillo y se usa un filtro de detección en el naranja (610/20). Las señales de H3K27acetyl se muestran en forma de histograma, igual que las utilizadas para la H3, ya que se usa el mismo

anticuerpo secundario (Figura 5a), mientras que las señales obtenidas para la H3K27me3 se muestran también en forma de histograma (Figura 5b). Además, para el análisis de resultados de estas señales, no solo se obtuvo la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida a partir de los citogramas, sino que se hizo un análisis de subpoblaciones (Figura 6).

Para el análisis de todas las muestras, se comenzaba analizando la muestra que utilizábamos como estándar, ajustando el pico de la señal obtenida en el histograma a 10^4 (escala logarítmica), que es a partir de donde el citómetro detecta las señales positivas. Tras este ajuste, se analizaron todas las muestras a estudiar. Tras esto, se obtuvo el MFI de todas las señales y, además, el porcentaje de positivos (h3 high) en el caso de H3.

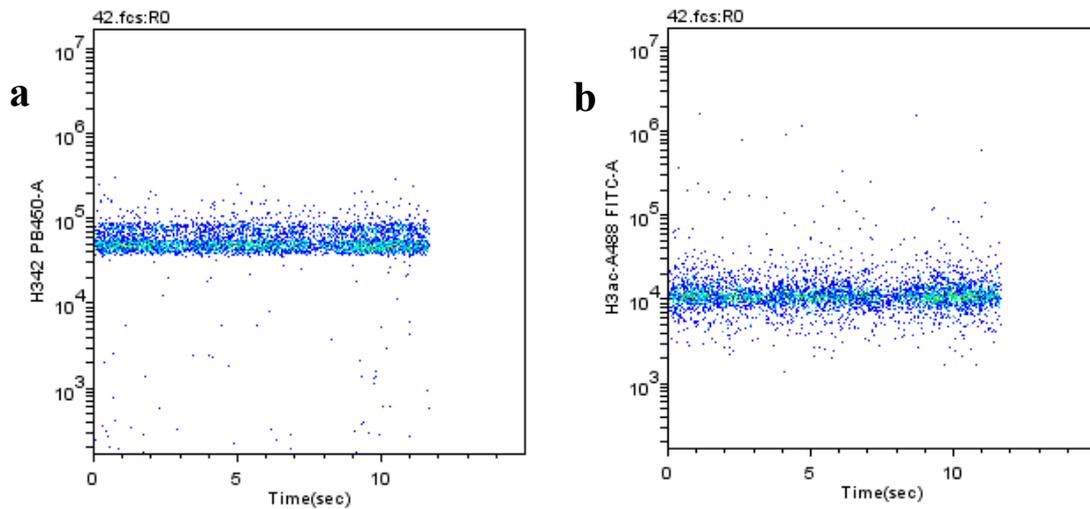


Figura 3. Citogramas que muestra (a) el flujo de paso del fluorocromo H342 en el tiempo para comprobar que el flujo fuese estable y las mediciones fiables, (b) el flujo de paso del fluorocromo Alexa 488 en el tiempo para comprobar que el flujo fuese estable y las mediciones fiables.

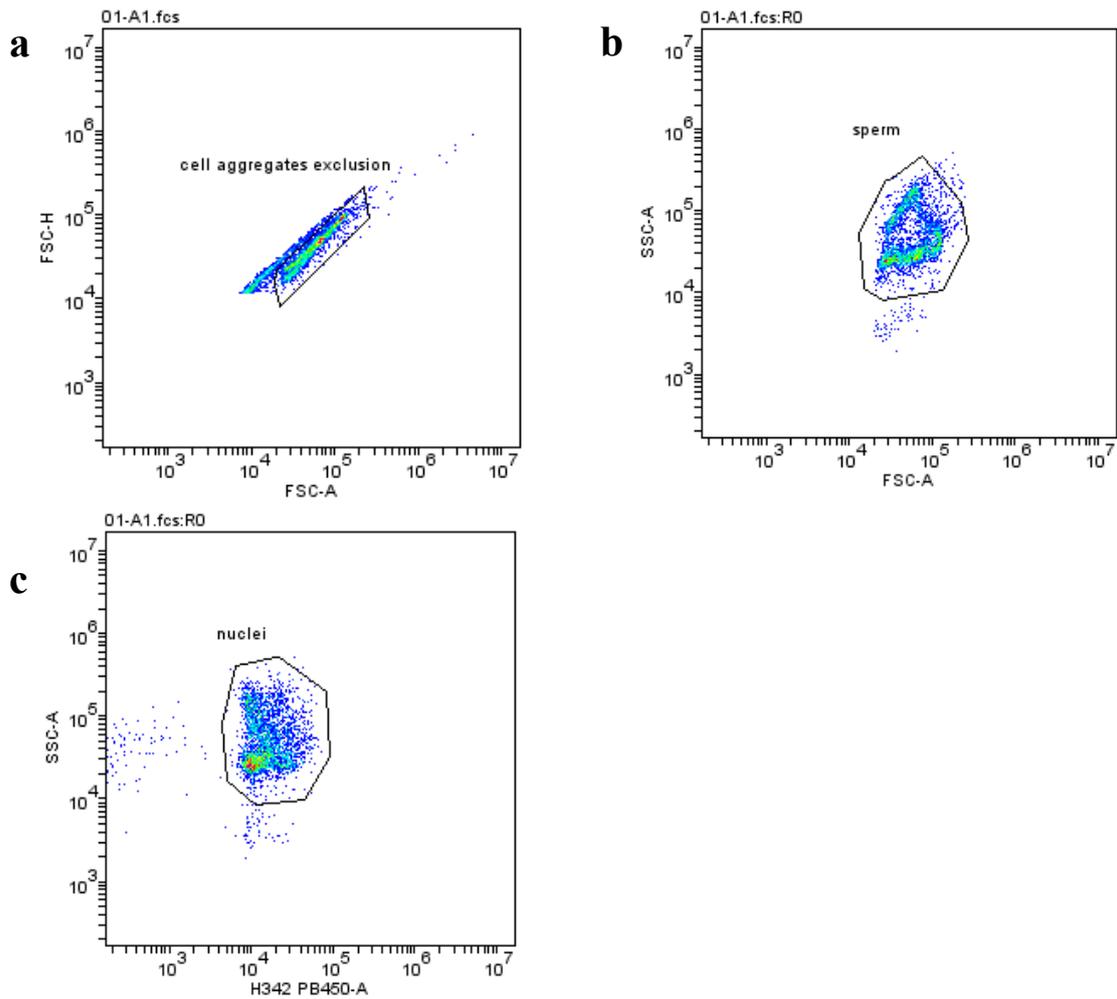


Figura 4. Citogramas que muestran (a) la eliminación de agregados celulares/dobletes, (b) el total de las partículas que el citómetro consideró como células en función de su tamaño/complejidad (FSC/SSC), (c) el uso del fluorocromo H342 para la identificación de las células espermáticas por medio de la detección de núcleos.

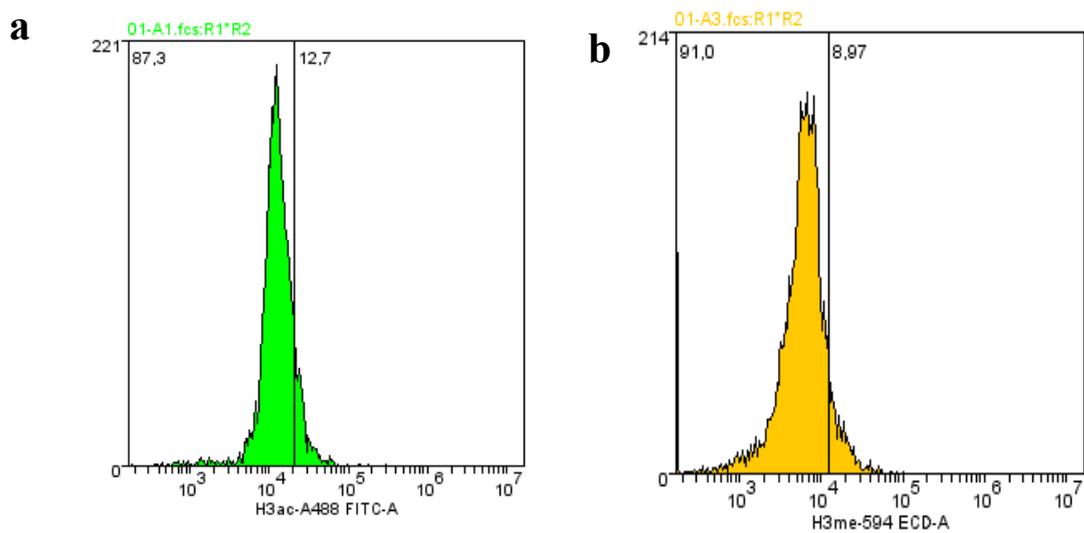


Figura 5. Histograma que muestra (a) la señal de Alexa 488 en función de los espermatozoides totales, (b) la señal de Alexa 594 en función de los espermatozoides totales.

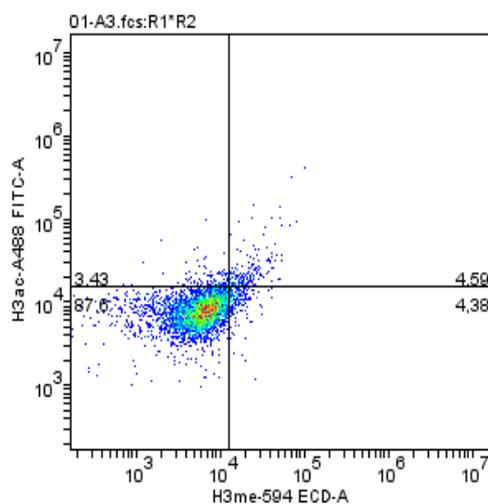


Figura 6. Citograma que permite determinar qué tipo de señales de trimetilación y acetilación presentan las células para dividir las en grupos de subpoblaciones espermáticas.

3.3.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de este estudio se llevó a cabo usando modelos lineales de efectos mixtos con el entorno estadístico R.

Los parámetros a estudiar fueron la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) para H3 total, H3K27ac y H3K27me3. También se estudió el porcentaje de espermatozoides con alto marcaje de H3 total, así como las poblaciones con el doble marcaje de H3K27ac y H3K27me3 (bajo, intermedio y alto para cada anticuerpo).

4. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros obtenidos mediante la evaluación de la H3 (MFI y % de H3 alta) y de la detección de H3K27acetyl y H3K27me3 (MFI y análisis de subpoblaciones espermáticas).

4.1 Resultados de la inmunodetección de la H3

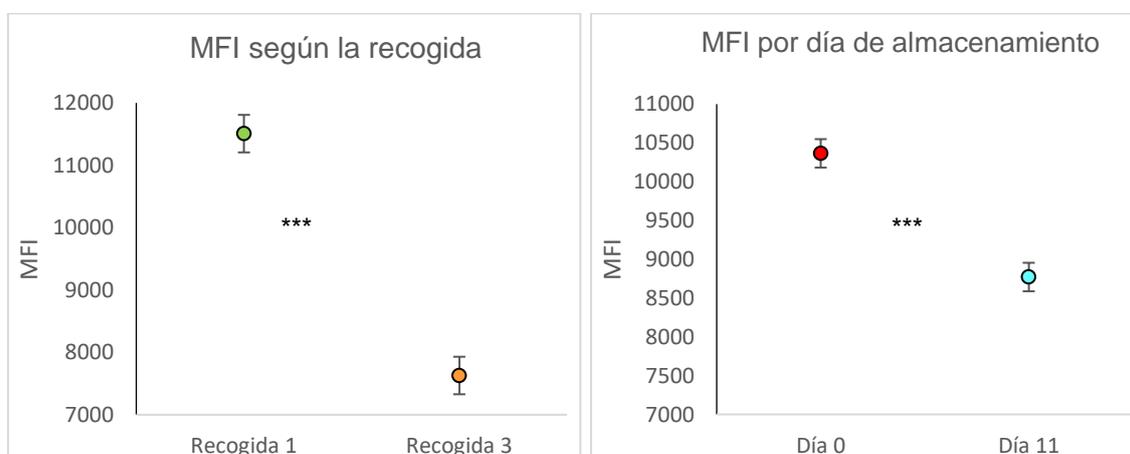
En este caso se analizaron dos parámetros: la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) y el porcentaje de H3 alta. Este último parámetro hace referencia a aquellos espermatozoides que presentan gran cantidad de marcaje de H3. Los resultados más relevantes para la discusión serán mencionados a continuación.

Como se puede observar, tanto en el caso del MFI, como en el caso del porcentaje de h3 high, se ha producido una disminución en los valores, tanto en la recogida 3 con

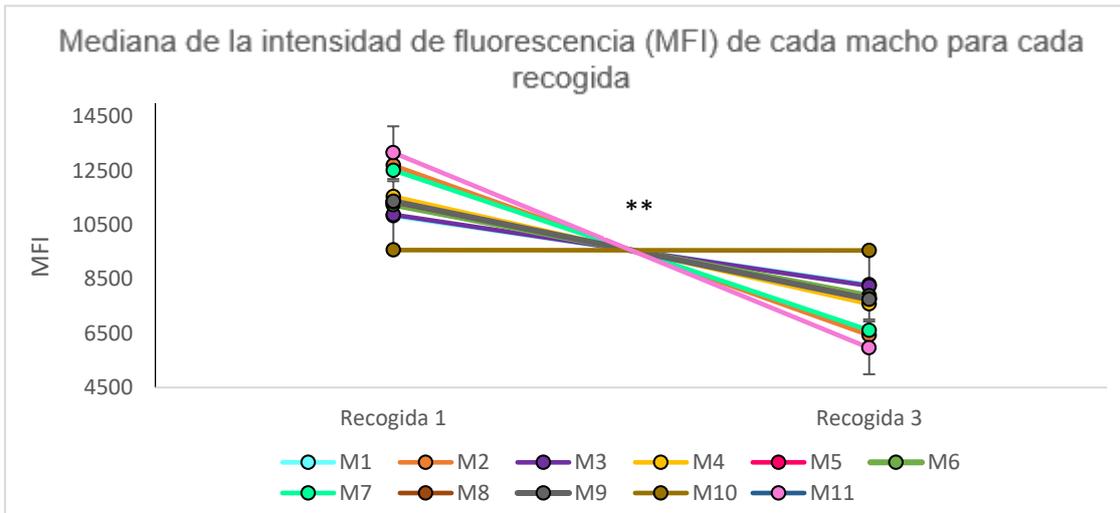
respecto a la 1 como en el día 11 (D11) con respecto al día 0 (D0). En el caso del MFI, esta disminución fue de $11507,39 \pm 300,68$ en la recogida 1 a $7628,96 \pm 300,68$ en la recogida 3 (Gráfica 1^a; $P < 0,001$) y de $10365,23 \pm 183,59$ en D0 a $8771,13 \pm 183,59$ en D11 (Gráfica 1b; $P < 0,001$). Por su parte, para los valores del % de h3 high el descenso en función de la recogida fue de $16,2086 \pm 0,69\%$ en la recogida 1 a $6,1563 \pm 0,69\%$ en la recogida 3 (Gráfica 3a; $P < 0,001$) y en función del día de almacenamiento estos valores pasaron de $12,24636 \pm 0,39\%$ en D0 a $10,11864 \pm 0,39\%$ en D11 (Gráfica 3b; $P < 0,01$).

Al centrarnos en la diferencia entre machos y recogidas, se obtuvo que, tanto para el MFI como para el porcentaje de h3 high, hubo una disminución en los valores de los machos de la recogida 1 a la 3. Entre unos machos y otros la disminución fue diferente y, en algún caso, la diferencia no fue aparente.

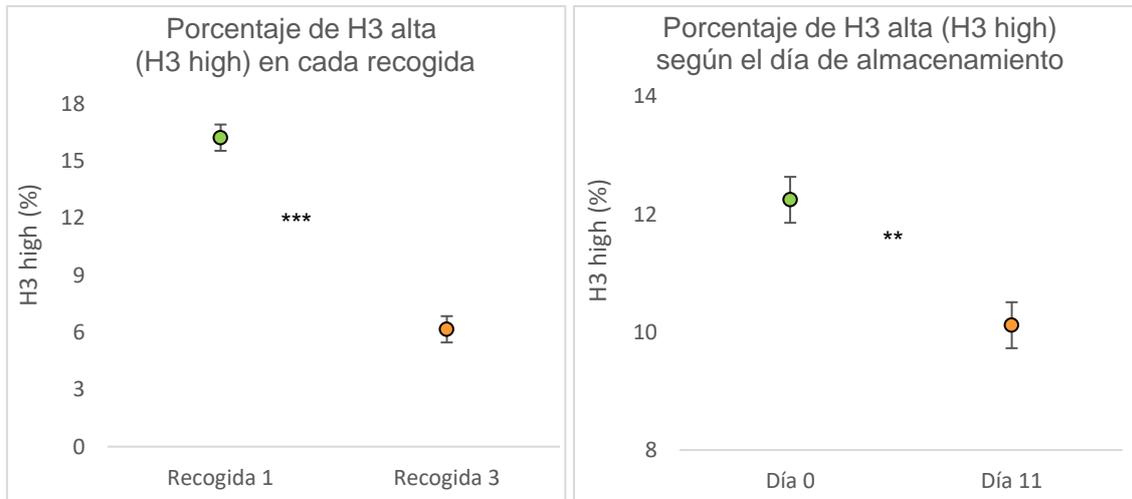
Para el MFI, de los distintos machos analizados, los machos 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 presentan una caída clara, mientras que los demás no presentan diferencias significativas (Gráfica 2; $P < 0,01$). En el caso del porcentaje de h3 high, todos los machos analizados presentan diferencias significativas, con una caída clara de los valores (Gráfica 4; $P < 0,05$).



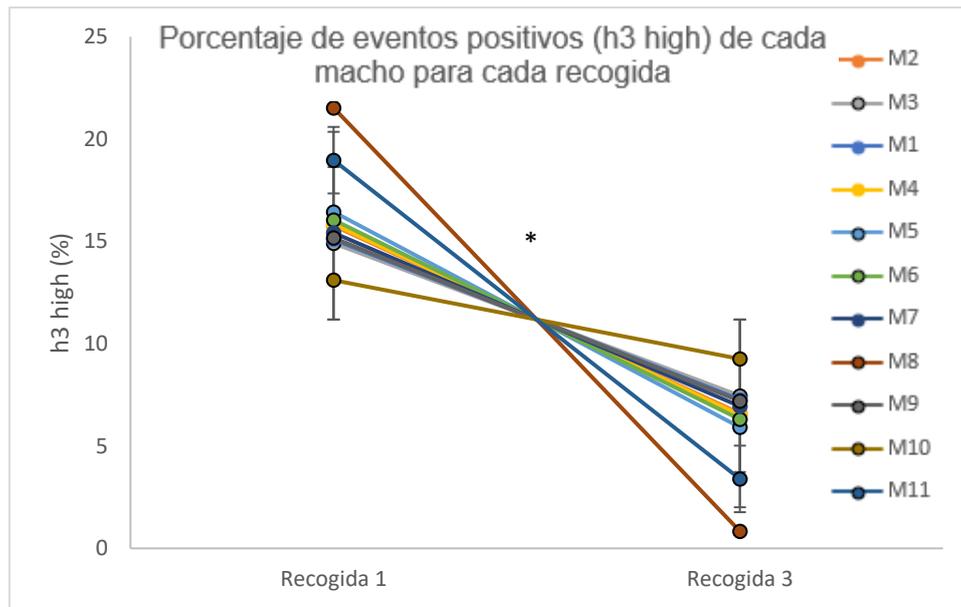
Gráfica 1. Representación gráfica de la media \pm error estándar del MFI de la H3 de las muestras espermáticas de los verracos ($n=11$) en función la recogida (Gráfica 1a) y en función del día de almacenamiento de las muestras (Gráfica 1b). Los niveles de significación se representan mediante: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$) y * ($P < 0,05$).



Gráfica 2. Representación gráfica de la media \pm error estándar del MFI de la H3 de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) de cada uno de los machos en cada una de las recogidas. Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).



Gráfica 3. Representación gráfica de la media \pm error estándar del porcentaje de H3 high de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) en función la recogida (Gráfica 3a) y en función del día de almacenamiento de las muestras (Gráfica 3b). Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).



Gráfica 4. Representación gráfica de la media \pm error estándar del porcentaje de h3 high de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) de cada uno de los machos en cada una de las recogidas. Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).

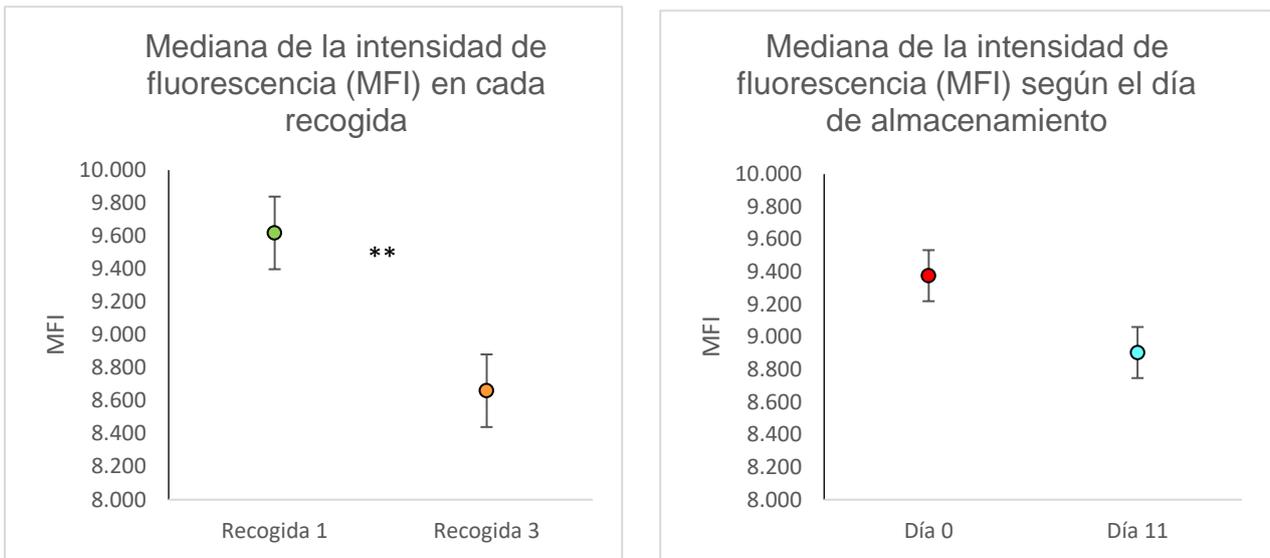
4.2 Resultados de la inmunodetección de H3K27acetyl

En este caso, únicamente se analizó la mediana de la intensidad de fluorescencia. De la misma forma que en el caso anterior, se mencionarán aquellas diferencias cuya significancia sea interesante para la discusión de los resultados.

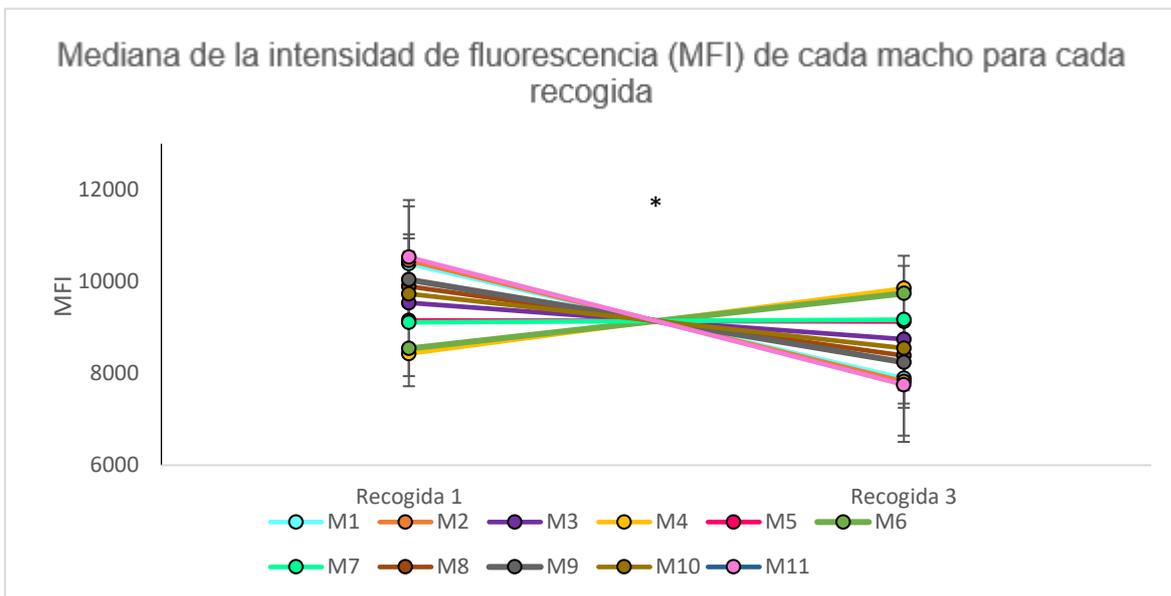
En cuanto a la acetilación, del mismo modo que con la señal de la H3 total, se produjo un descenso en los valores del MFI, tanto de la recogida 1 a la 3 como del D0 al D11: de $9618,78 \pm 220,31$ en la recogida 1 a $8661,25 \pm 220,31$ en la recogida 3 (Gráfica 5a; P<0,01) y de $9376,09 \pm 156,75$ en D0 a $8903,94 \pm 156,75$ en D11 (Gráfica 5b).

En cuanto a la diferencia entre machos y recogidas, ocurre lo mismo que en el caso anterior: los valores del MFI tienden a disminuir de la primera a la tercera recogida, aunque hay alguna excepción. En este caso, los que presentan una caída clara y, por tanto, diferencias significativas son el macho 1 y el 11. Por el contrario, en el 4 y el 6, el valor del MFI aumenta de la recogida 1 a la 3. Para el resto de machos, el valor del MFI se reduce de la recogida 1 a la 3, pero la caída no es tan clara. (Gráfica 6; P<0,05).

En este caso, únicamente presentan efectos significativos sobre el MFI entre recogidas y entre machos y recogidas.



Gráfica 5. Representación gráfica de la media \pm error estándar del MFI de la H3K27acetyl de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) en función la recogida (Gráfica 5a) y en función del día de almacenamiento de las muestras (Gráfica 5b). Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).



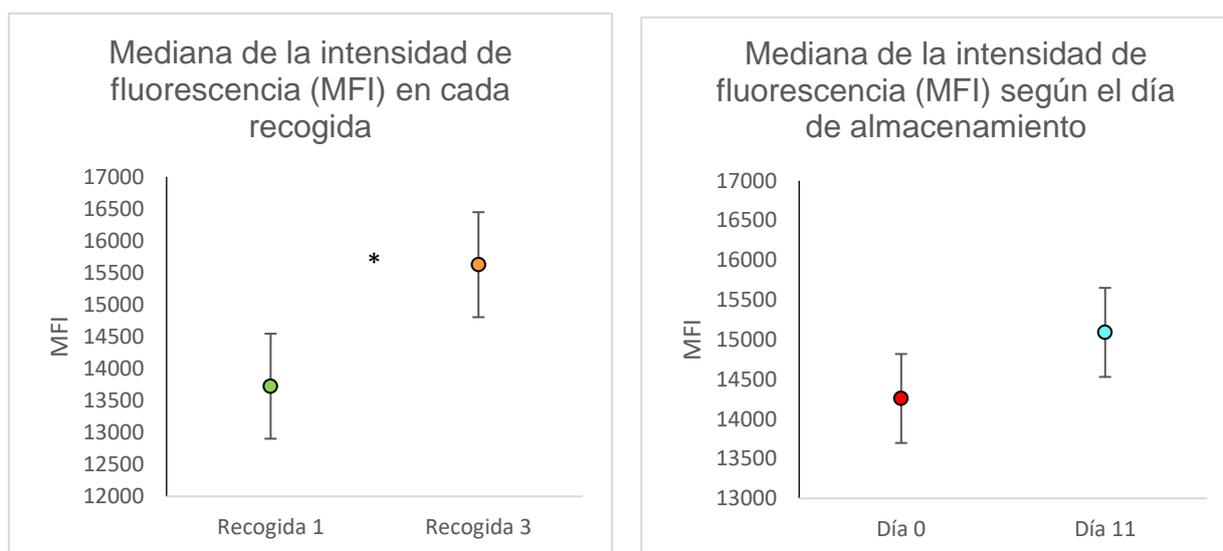
Gráfica 6. Representación gráfica de la media \pm error estándar del MFI de la H3K27acetyl de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) de cada uno de los machos en cada una de las recogidas. Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).

4.3 Resultados de la inmunodetección de H3K27me3

De la misma forma que en el caso anterior, se incluirá la representación gráfica de aquellas diferencias cuya significancia sea interesante para la discusión de los resultados, siendo el parámetro analizado el MFI.

Con respecto a la trimetilación, ocurre el caso contrario a con la acetilación: se produjo un aumento de los valores del MFI. Se pasó de $13723,91 \pm 821,46$ en la recogida 1 a $15625,14 \pm 821,46$ en la recogida 3 (Gráfica 7a; $P < 0,05$) y de $14258,46 \pm 560,45$ en D0 a $15090,59 \pm 560,45$ en D11 (Gráfica 7b).

En este caso, solamente se aprecian diferencias significativas en el MFI entre la recogida 1 y la 3. Del mismo modo que en el apartado anterior, incluyo la gráfica de las muestras de cada grupo de verracos en los días 0 y 11 de almacenamiento.



Gráfica 7. Representación gráfica de la media \pm error estándar del MFI de la H3K27me3 de las muestras espermáticas de los verracos ($n=11$) en función la recogida (Gráfica 7a) y en función del día de almacenamiento de las muestras (Gráfica 7b). Los niveles de significación se representan mediante: *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$) y * ($P < 0,05$).

4.4 Subpoblaciones de acetilación y trimetilación

Para el análisis de las señales de H3K27acetyl y H3K27me3, además de analizar la intensidad media de fluorescencia (MFI), se hizo un análisis de subpoblaciones de los espermatozoides, surgiendo un total de 9 subpoblaciones diferentes en función de la señal que manifestaba cada célula según lo mostrado en el siguiente esquema:

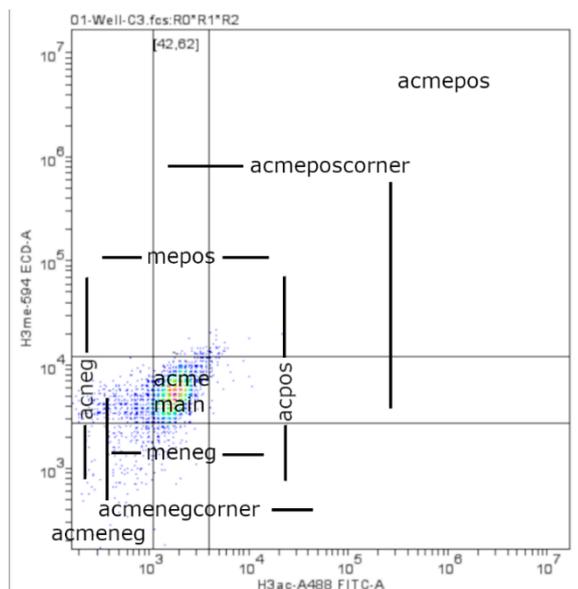
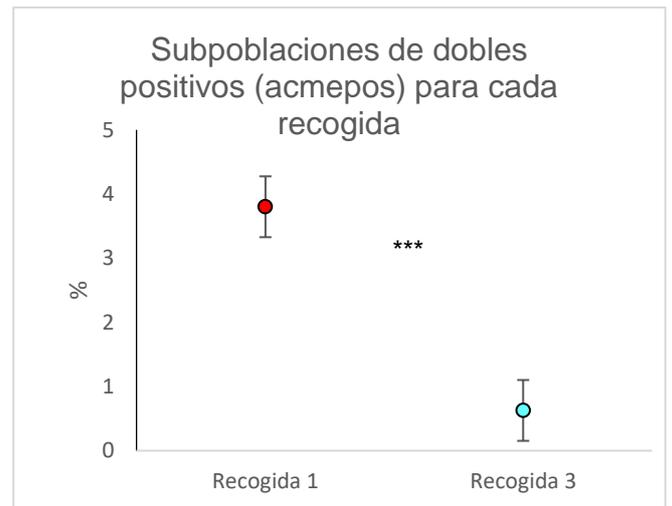
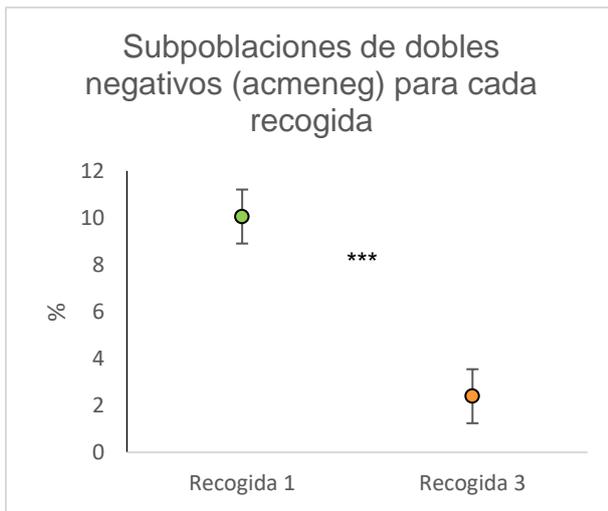


Figura 7. Citograma que muestra las distintas poblaciones analizadas para los espermatozoides de las muestras, en función de las señales que presentaban cada una. La definición de las identificaciones que se muestran en el citograma corresponden a lo siguiente: suma de las señales negativas de acetilación (acneg), suma de las señales positivas de acetilación (acpos), suma de las señales negativas de trimetilación (meneg), suma de las señales positivas de trimetilación (mepos), suma de las señales negativas para acetilación y trimetilación (acmeneg), suma de las señales positivas para acetilación y trimetilación (acmepos), población central (acmemain), negativos para alguna de las dos señales (acmenegcorner), positivos para alguna de las dos señales (acmeposcorner).

Para tener más información adicional al MFI para cada una de estas señales, es interesante destacar los resultados obtenidos para los dobles negativos y para los dobles positivos. En cuanto a los dobles negativos, se observó que hay diferencias significativas solo entre ambas recogidas (pero no entre machos ni en el día de almacenamiento), siendo menor esta intensidad en la tercera recogida ($10,05 \pm 1,15\%$) que en la primera ($2,39 \pm 1,15\%$). Lo mismo ocurre con los dobles positivos, en los que encontramos también diferencias significativas solo entre ambas recogidas igual que con los dobles negativos, siendo menor esta subpoblación en la tercera recogida ($0,62 \pm 0,47\%$) que en la primera ($3,80 \pm 0,47\%$).



Gráfica 8. Representación gráfica de la media \pm error estándar del % de dobles negativos (Gráfica 8a) y de dobles positivos (Gráfica 8b) de las subpoblaciones de H3K27me3 y H3K27acetyl de las muestras espermáticas de los verracos (n=11) en función la. Los niveles de significación se representan mediante: *** (P < 0,001), ** (P < 0,01) y * (P < 0,05).

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio se llevó a cabo un protocolo de detección mediante citometría de flujo de la H3, así como de dos de sus alteraciones epigenéticas más comunes en la lisina 27: acetilada (H3K27acetyl) y trimetilada (H3K27me3), de un conjunto de muestras seminales procedentes de diferentes verracos en diferentes momentos de su vida reproductora. Además, todas las muestras se volvieron a analizar tras 11 días de almacenamiento, para asegurar que haya cambios en la cromatina que podrían ocurrir durante el almacenamiento refrigerado.

El porcentaje final de histonas en la cromatina es muy variable: en el caso del ser humano, aproximadamente el 97,1% de las histonas son reemplazadas por protaminas. Por el contrario, en el caso de la cromatina bovina, únicamente el 86,6% de las histonas son reemplazadas por protaminas. Esto significa que, más o menos, un 13,4% de las histonas permanecen en la cromatina espermática, generando un menor grado de compactación del ADN (Kutchy *et al.*, 2018). Los cerdos, por su parte, también presentan un bajo porcentaje de histonas, ya que tienen una cromatina muy compacta. Por tanto, es necesario tener en cuenta la especie para poder valorar correctamente estos parámetros.

En cuanto al análisis de la H3 total, se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) y el porcentaje de h3 high. Los resultados muestran que el MFI, así

como el % de h3 high en los diferentes verracos disminuyen de D0 a D11 de almacenamiento y también disminuyen de la recogida 1 a la recogida 3 y para cada macho de una recogida a otra. Esta disminución quiere decir que el número de histonas, H3 en este caso, se ha reducido, razón por la cual la intensidad es menor y se obtiene un menor porcentaje de eventos en D11 y en la recogida 3.

Considerando que las protaminas son esenciales para la compactación de la cromatina espermática, la sustitución insuficiente de histonas por protaminas puede reducir el nivel de condensación de la cromatina. Se ha demostrado que niveles elevados de retención de histonas están asociados con una baja condensación de la cromatina (De Oliveira *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta esto, al analizar los resultados, se puede extraer que los verracos tenían una mayor compactación de la cromatina en la recogida 3 que en la recogida 1, ya que la recogida 3 presenta un valor más bajo de MFI, así como un porcentaje más bajo de H3 alta. Lo mismo ocurría para el % de H3 high, ya que había una menor cantidad de células que retenían mucha H3 en la recogida 3. Sin embargo, para poder hablar de esto más en profundidad, habría que también llevar a cabo un análisis de compactación.

Esto se puede atribuir a que, al estar ambas recogidas separadas por 6 meses, en la primera de ellas los verracos todavía acababan de entrar al centro y eran muy jóvenes, sin haber alcanzado la madurez sexual todavía, por lo que podían estar siendo sometidos a modificaciones en la cromatina. Se han realizado diversos estudios sobre esto. Czubaszek *et al.* (2020) llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de la edad del verraco sobre la estabilidad del material genético de su esperma. Se observó que la edad del verraco tenía un efecto significativo sobre la estabilidad del ADN, así como sobre la estructura de la cromatina espermática. Entre los resultados más destacables, se encuentra que la mayor proporción de espermatozoides con retención anormal de histonas (8,01%) se observó en el grupo más joven de verracos, lo que apoya los resultados obtenidos en el trabajo.

Además de con la compactación de la cromatina, esto también puede tener cierta relación con la fertilidad. En un estudio, De Oliveira *et al.* (2013), analizó la cantidad de histonas retenidas en la cromatina en un grupo de toros de elevada fertilidad y en otro de baja fertilidad. Se observó que había una mayor retención de histonas en el grupo de baja fertilidad. Este estudio concluye que una ratio anormal de protaminas/histonas en los espermatozoides afecta negativamente a la cromatina espermática. Para contrastar más

esta información, Hammoud *et al.* (2011) sugiere que esta diferente retención de histonas es la razón principal para la diferencia entre hombres fértiles y su contraparte estéril.

También cabe destacar las diferencias entre los valores de MFI y de h3 high entre el día 0 y el día 11. Para ambos casos, se obtuvieron valores más bajos para el día 11. Es decir, aquellas muestras que, antes de ser congeladas a -80°C , fueron mantenidas a 17°C durante 11 días presentan un menor contenido de histonas retenidas en la cromatina. Esta disminución se puede deber a pequeños cambios que se producen en la viabilidad celular. Esto puede ocurrir ya que el almacenamiento de semen de verraco prolongado en diluyente de larga duración a 17°C indujo una disminución de la integridad del ADN espermático (Bielas *et al.*, 2017).

En cuanto a H3K27acetyl y H3K27me3 se analizó el MFI y se hizo un análisis de subpoblaciones en función a estas señales para obtener información que no podríamos obtener solo con el MFI. Nuestros resultados muestran que, en la acetilación, el valor del MFI disminuye entre días y recogidas. Esto quiere decir que el número de H3 cuya lisina 27 se encontraba acetilada se redujo entre la recogida 1 y la 3 y entre el día 0 y el 11. Por el contrario, en el caso de la trimetilación, esta aumenta tanto entre días como entre recogidas. Esto significa que el número de H3 cuya lisina 27 se encontraba trimetilada aumentó de la recogida 1 a la 3, así como del día 0 al 11.

Existen diversas variantes de las histonas canónicas, que se diferencian de estas en algún punto de la secuencia de aminoácidos, y que tienen distintos papeles en una amplia gama de procesos (Wang *et al.*, 2019). Por un lado, la acetilación de histonas está fuertemente asociada con la arquitectura de la eucromatina, reduciendo los enlaces histona-ADN y facilitando la sustitución de protaminas y la activación de la transcripción durante la espermatogénesis (De Oliveira *et al.*, 2013). Por el contrario, las histonas metiladas se encuentran principalmente en regiones de heterocromatina, donde los genes son ocasionalmente silenciados (Fischle *et al.*, 2003). Así, la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3, que es la señal que nosotros estamos estudiando, se asocia con la represión de la transcripción, así como como con el control de la expresión génica en el tracto reproductivo masculino o la diferenciación de espermatozoides y cromosomas X, entre otras (De Oliveira *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta esto, se puede comprobar que en la recogida 1, donde la señal de acetilación era mayor, había una mayor transcripción de genes durante la

espermatogénesis. No obstante, esta señal se redujo en la recogida 3, mientras que la de trimetilación aumentó. De esto se puede extraer que, en la recogida 3, la represión de la transcripción de genes aumentó de la recogida 1 a la 3. Lo mismo ocurrió de D0 a D11.

Estas diferencias entre recogidas pueden deberse a lo mismo que en el caso de la H3 total: la diferente edad de los verracos entre la primera y la tercera recogida, no habiendo alcanzado todavía la madurez sexual en la primera y pudiendo estar sometidos a cambios en la cromatina espermática, como indica el estudio de Czubaszek *et al.* (2020). Sumado a esto, es posible que diversos factores externos que afectaran a los verracos. Uno de ellos puede ser las condiciones atmosféricas: la primera recogida tuvo lugar en enero, mientras que la tercera se realizó a mediados de julio. Este aumento tan grande de la temperatura y disminución de la humedad podría haber ayudado a que se produjesen estos cambios en la cromatina de los verracos.

Por último, comentar que estas variaciones en la acetilación y trimetilación de la H3K27, del mismo modo que con la H3 total, también pueden estar relacionadas con la fertilidad. Las modificaciones postraduccionales específicas de la H3 están localizadas en las regiones del genoma espermático que están activas durante la espermatogénesis y el desarrollo embrionario temprano (De Oliveira *et al.*, 2013). Esto hace a las variaciones H3K27ac y H3K27me3 muy importantes para el análisis de la fertilidad. El estudio realizado por Kutchy *et al.* (2018), sugiere que las anomalías en la acetilación y trimetilación de esta lisina 27 en los espermatozoides podría reflejar problemas en la espermiogénesis, así como indicar la capacidad del espermatozoide para fecundar y activar el óvulo y ayudar al desarrollo del embrión.

Como perspectivas futuras de este estudio, se terminarán de analizar y procesar los datos de todas las muestras de verracos para las 6 recogidas y se analizarán conjuntamente con los resultados de fertilidad proporcionados por el centro de inseminación. De esta forma, se evaluará la fiabilidad de esta novedosa técnica para la detección de los verracos subfértiles de manera temprana.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio, a través del estudio de la H3 y de dos de sus modificaciones postraduccionales (H3K27acetyl y H3K27me3) mediante citometría de flujo, nos han permitido alcanzar una serie de conclusiones:

1. Se obtuvo una diferencia en la detección de todas estas señales entre recogidas, lo cual puede venir de modificaciones en la espermatogénesis.
2. El almacenamiento prolongado de dosis de IA porcina en refrigeración provoca cambios significativos en la estructura de la cromatina del espermatozoide, reduciéndose la detección de todas estas señales, pudiendo ser debido a cambios en la viabilidad celular.
3. Se obtuvo una diferente detección de estas señales entre los diferentes machos, lo cual es importante, ya que uno de nuestros objetivos es detectar verracos subfértiles.

7. REFERENCIAS

- 3tres3 (2022) *UE: Importaciones y exportaciones De Carne de Cerdo en 2022*. Disponible en: https://www.3tres3.com/ultima-hora/ue-importaciones-y-exportaciones-de-carne-de-cerdo-en-2022_49231/ (Accedido: 11 de julio de 2023).
- Bielas, W. et al. (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). doi:10.1186/s13028-017-0325-9.
- Cinco Días (2021) *España se despide de sus mejores años de exportación de carne de cerdo*. Disponible en: https://cincodias.elpais.com/cincodias/2021/10/09/economia/1633768478_551773.html (Accedido: 2 de marzo de 2022).
- Czubaszek, M., Andraszek, K. and Banaszewska, D. (2020) "Influence of the age of the individual on the stability of boar sperm genetic material", *Theriogenology*, 147, pp. 176–182. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.018.
- Dogan, S., Vargovic, P., Oliveira, R., Belser, L. E., Kaya, A., Moura, A., Sutovsky, P., Parrish, J., Topper, E. y Memili, E. (2015) "Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls", *Biology of Reproduction*. Society for the Study of Reproduction, 92(4), pp. 92–93.
- Höfner, L., Luther, A. M. and Waberski, D. (2020) "The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa", *Animal Reproduction Science*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.anireprosci.2020.106290.
- INTERPORC (2021) El sector porcino de capa blanca muestra su liderazgo reconociendo el valor de sus profesionales. Disponible en: <https://interporc.com/2021/09/30/interporc-sector-porcino-capa-blanca-reconoce-valor-de-sus-profesionales?cat=actualidad/prensa> (Accedido: 10 de mayo de 2023).
- Knox, R. V. (2016) "Artificial insemination in pigs today", *Theriogenology*. Elsevier Inc., 85(1), pp. 83–93. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.
- Kutchy, N. A., Menezes, E. S. B., Chiappetta, A., Tan, W., Wills, R. W., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., Perkins, A. D. and Memili, E. (2018) "Acetylation and methylation of sperm histone 3 lysine 27 (H3K27ac and H3K27me3) are associated with bull fertility", *Andrologia*. Blackwell Publishing Ltd, 50(3). doi:10.1111/and.12915.
- Le Blévec, E., Muroňová, J., Ray, P. F. and Arnoult, C. (2020) "Paternal epigenetics: Mammalian sperm provide much more than DNA at fertilization", *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier Ireland Ltd. doi:10.1016/j.mce.2020.110964.
- Li, M. y Fang, Y. da (2015) "Histone variants: the artists of eukaryotic chromatin", *Science China Life Sciences* 2015 58:3. Springer, 58(3), pp. 232–239.
- MAPA (2022) *Porcino*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/#:~:text=Sector%20porcino%20en%20Espa%C3%B1a&text=Dentro%20de%20las%20producciones%20ganaderas,de%20porcino%2C%20despu%C3%A9s%20de%20China.> (Accedido: 17 mayo 2023).
- De Oliveira, R. V., Dogan, S., Belser, L. E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G. and Memili, E. (2013) "Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility", *Reproduction*, 146(3), pp. 263–272. doi:10.1530/REP-12-0399.
- Patankar, A. y Parte, P. (2017) "Sperm Chromatin Compaction and Male Infertility", en Singh, R. y Singh, K. (eds.) *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*. Singapore: Springer, pp. 295-315
- 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. doi:10.1111/rda.13389.
- Roca, J., Parrilla, I., Bolarin, A., Martínez, J. E. A. et al. (2016) "Will AI in pigs become more efficient?", *Theriogenology*, 86(1), pp. 187–193. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.026.

Roca, J., Broekhuijse, M. L. W. J., Parrilla, I., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E. A. y Bolarin, A. (2015) "Boar Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized?", *Reproduction in Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Ltd, 50, pp. 48–55.

Rodríguez-Martínez, H. (2015) *Evaluación de la calidad seminal en el verraco*.

Schulze, M., Nitsche-Melkus, E., Jakop, U., Jung, M. et al. (2019) "New trends in production management in European pig AI centers", *Theriogenology*, 137, pp. 88–92. Doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.042.

Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F. et al. (2019) "Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges", *Theriogenology*, 137, pp. 2–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.030.

Waberski, D., Schapmann, E., Henning, H., Riesenbeck, A. y Brandt, H. (2011) "Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI", *Theriogenology*. *Theriogenology*, 75(2), pp. 337–345.

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

Knox, R. V. (2016) "Artificial insemination in pigs today", *Theriogenology*. Elsevier Inc., 85(1), pp. 83–93. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.009.

Kutchy, N. A., Menezes, E. S. B., Chiappetta, A., Tan, W., Wills, R. W., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., Perkins, A. D. and Memili, E. (2018) "Acetylation and methylation of sperm histone 3 lysine 27 (H3K27ac and H3K27me3) are associated with bull fertility", *Andrologia*. Blackwell Publishing Ltd, 50(3). doi:10.1111/and.12915.

De Oliveira, R. V., Dogan, S., Belser, L. E., Kaya, A., Topper, E., Moura, A., Thibaudeau, G. and Memili, E. (2013) "Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility", *Reproduction*, 146(3), pp. 263–272. doi:10.1530/REP-12-0399.

Rodríguez-Martínez, H. (no date) *Evaluación de la calidad seminal en el verraco*.

Wang, T., Gao, H., Li, W. and Liu, C. (2019) "Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility", *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fgene.2019.00962.