



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON
PLASMA SEMINAL SOBRE LA
CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES
PORCINOS CRIOPRESERVADOS**

**EFFECTS OF SEMINAL PLASMA
TREATMENT ON CHROMATIN IN
CRYOPRESERVED PORCINE SPERM**

ALEJANDRO VILLARÍAS REDONDO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Junio 2021

FIRMA DEL ALUMNO
Fdo.: Alejandro Villarías Redondo

A handwritten signature in black ink on a light-colored, textured background. The signature is highly stylized and cursive, starting with a large loop on the left and ending with a sharp, angular flourish on the right.

En León, a 1 de julio de 2021

Índice

1	Introducción	1
1.1	Importancia de la industria porcina	1
1.2	Importancia de las técnicas de reproducción asistida en la industria porcina. Comparativa entre países.....	1
1.3	IA: Conservación del semen: refrigerado vs congelado.....	2
1.4	Estructura interna y capacitación del espermatozoide.....	3
1.5	Efectos adversos en el espermatozoide congelado	4
1.6	Soluciones a la pérdida de viabilidad de las muestras espermáticas congeladas: plasma seminal	5
1.7	Investigaciones Previas.....	6
1.8	Monobromobimano (mBBr).....	7
2	OBJETIVO.....	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1	Diseño experimental	8
3.2	Preparación de las muestras.....	9
3.3	Análisis previos de las muestras	10
3.4	Análisis de los puentes disulfuro	11
3.5	Análisis espermático mediante citometría.....	12
3.6	Análisis estadístico	14
4	Resultados	14
4.1	Análisis de la fisiología y de la cromatina espermática.....	14
4.2	Resultados del mBBr mediante citometría de flujo.....	17
4.3	Análisis de correlaciones de los resultados	20
5	Discusión.....	22
6	Conclusiones	26
7	Referencias	26

Resumen

La inseminación artificial es utilizada de forma rutinaria en la industria porcina. Sin embargo, la utilización de semen criopreservado es muy reducida debido a los daños y alteraciones sufridas por los espermatozoides, que se traduce en menores tasas de fertilidad. Algunos de estos daños afectan a la estructura nuclear, provocando roturas de los puentes disulfuro entre las protaminas que compactan el material genético. Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar muestras espermáticas porcinas que fueron incubadas con plasma seminal (PS) a 0 %, 10 % y 50 %, durante 0, 1, 2, 3 y 4 h tras la criopreservación, para evaluar si el PS mejoraba la calidad espermática. Se analizó la cantidad de puentes disulfuro con la tinción de monobromobimano (mBBr), y se compararon los resultados con investigaciones previas realizadas sobre las mismas muestras. Los resultados mostraron cómo la aplicación de 50 % de plasma seminal preservó la integridad de los puentes disulfuro ($P < 0,001$), mientras que la aplicación de 10 % PS no mostró cambios tan significativos. El plasma seminal permitió el mantenimiento de la compactación de la cabeza espermática, pero causó múltiples daños asociados al incremento de ROS intracelulares conllevando una disminución de la viabilidad, especialmente en las poblaciones de espermatozoides más débiles.

Palabras clave

Criopreservación espermática, espermatozoide porcino, monobromobimano, plasma seminal, puentes disulfuro.

Abstract

Artificial insemination is routinely used in the boar industry. However, cryopreserved sperm is not widely used due to the damage and alterations in the sperm, leading to lower fertility rates. Some of these damages will affect the nuclear structure, causing breaks in the disulfide bridges between protamines that compact the genetic material. For this reason, the objective of this study was analyzed sperm boar samples incubated with seminal plasma (PS) at 0%, 10%, and 50%, during 0, 1, 2, 3, and 4 h after cryopreservation, to evaluate if the PS improved the sperm quality. The results showed how the application of 50% of seminal plasma preserved the integrity of the disulfide bridges ($P < 0.001$), while the application of 10% PS did not show such significant changes. The seminal plasma allowed the compaction of the sperm head to be maintained, but caused multiple damages associated with the increase in intracellular ROS, leading to a decrease in viability, especially in the weakest sperm populations.

Keywords:

Boar sperm, disulfide bonds, monobromobimane, seminal plasma, sperm cryopreservation.

1 Introducción

1.1 Importancia de la industria porcina en España

A nivel mundial la demanda de carne de cerdo se encuentra en continuo crecimiento. Actualmente constituye el 37% de toda la carne consumida (110 millones de toneladas métricas, Mt), en mayor cantidad que la carne de pollo (104 Mt) y la de vacuno (67 Mt) (Zhang *et al.*, 2018). A su vez, la producción cárnica es la cuarta industria española más importante, donde la carne porcina ha constituido el 66,5 % de la producción total en España en 2020. Gracias a un continuo crecimiento interanual en la producción, un 8,2 % entre 2019 – 2020 (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE), 2021), España se ha colocado como el mayor productor de carne de cerdo a nivel europeo con una producción de 5.023.550 toneladas, superando al anterior mayor productor: Alemania (*DG AGRI - Pigmear Production*, 2020).

Naciones Unidas prevé un aumento del 15% en la producción de carne porcina hasta el 2027 (FAO, 2018). En este contexto, la industria cárnica busca mejorar múltiples factores y desarrollar nuevas estrategias para lograr mayores tasas de producción y calidad, con la utilización de un menor número de animales productores (Parrilla *et al.*, 2020). Para lograr estas mejoras se están investigando ámbitos como la mejora genética (selección de las mejores poblaciones y la heterosis) y la eficiencia de la producción porcina (Roca *et al.*, 2000; Knox, 2016).

1.2 Importancia de las técnicas de reproducción asistida en la industria porcina. Comparativa entre países.

La reproducción asistida permite la inducción al embarazo de hembras mediante métodos que no sean el apareamiento natural, garantizando una producción continuada de grandes camadas, aumentando la eficiencia de la producción porcina (Parrilla *et al.*, 2020). En ganado porcino, la inseminación artificial (IA) es la técnica de reproducción asistida más utilizada, constituyendo un 90% de las técnicas de inseminación utilizadas en los países occidentales (Tabla 1). Esto ha permitido alcanzar altas cotas de eficiencia en los países con mayor producción porcina, contribuyendo a la salud y a la mejora genética. (Waberski *et al.*, 2019).

Tabla 1. Datos entre 2009-2019 de la producción porcina y la proporción de utilización de la inseminación artificial (IA) frente a otras técnicas. Se muestra la utilización de IA entre 85 al 100% en los 10 principales países productores de carne de cerdo, con la excepción de China (40%), donde se espera que la utilización de IA aumente los próximos años por la transformación de las granjas particulares a grandes productoras (Waberski *et al.*, 2019).

	Producción porcina 2018 (en 1.000 toneladas métricas)	Proporción estimada de IA (de la cría total)
China	54,650	40% **
EU	24,050	95%
USA	12,166	90%
Brasil	3,675	95%
Rusia	3,050	85% **
Vietnam	2,800	90%
Canadá	2,015	>95% **
Filipinas	1,600	85%
Corea del Sur	1,321	90%
Méjico	1,305	90%

Pese a la gran utilización de la IA y su predominante aplicación en la reproducción porcina, en un mercado tan competitivo como el de alimentación, se necesita obtener mayores eficiencias reproductivas con menores costes asociados (Waberski *et al.*, 2019). Por ello se busca la optimización de 3 factores principales en la IA: la disminución de volumen del semen utilizado en cada inseminación / ciclo estral, el desarrollo de nuevos dispositivos de inseminación para mejorar la eficiencia y la mejora en los métodos de conservación de los espermatozoides para evitar la pérdida de viabilidad (García-Vázquez *et al.*, 2019).

1.3 IA: Conservación del semen: refrigerado vs congelado

En la década de 1990, los avances en la IA se centraron en mejorar el almacenamiento de espermatozoides mediante refrigeración (17 – 20 °C), limitado a 3 días debido a una gran pérdida de viabilidad. El desarrollo de nuevos diluyentes permitió la conservación espermática sin disminuciones notables de fertilidad durante periodos de tiempo más prolongados. Esto permitió el envío de muestras a regiones remotas y países con mayores extensiones de ganadería o con sistemas de transporte menos desarrollados (Knox, 2016). Sin embargo, no fue hasta 1960-1970 cuando se consiguió utilizar por primera vez la IA con semen congelado (y, posteriormente, descongelado). Esta técnica permitía el almacenaje y conservación de las muestras durante largos periodos de tiempo, permitiendo la recolección, producción de grandes cantidades de dosis y su envío a grandes distancias (Knox, 2016), pero

presentaba un rendimiento muy inferior frente a la utilización de semen refrigerado (Yeste, Rodríguez-Gil y Bonet, 2017).

Actualmente, pese a los avances en los procesos de congelación del semen en porcino, la preservación de muestras espermáticas refrigeradas continúa siendo el principal método para su almacenamiento hasta la inseminación (Waberski *et al.*, 2019), debido a los problemas causados por la criopreservación en la supervivencia espermática y disminución de las tasas de fertilidad (Knox, 2016).

1.4 Estructura interna y capacitación del espermatozoide

Para entender qué causa las pérdidas de viabilidad en la criopreservación es necesario entender la estructura y formación de los espermatozoides. Una clara diferencia frente al desarrollo del resto de células del individuo se da durante la espermatogénesis, donde el ADN espermático sufre una compactación del 80 – 85 %. En este proceso se sustituyen las histonas somáticas, que previamente compactaban el núcleo, por histonas testículo-específicas, sustituidas posteriormente por proteínas de transición y finalmente protaminas. Esto logra una compactación de la estructura nuclear 6 veces mayor (Patankar y Parte, 2017).

Las protaminas son pequeñas proteínas con una gran cantidad de residuos de arginina, que poseen un gran carácter básico, lo que les confiere la capacidad de anclarse al ADN e introducirse en los pequeños huecos del genoma para lograr la máxima compactación. Además, gracias a sus residuos de cisteína van a generar **puentes disulfuro con otras protaminas por la oxidación entre 2 grupos tioles** (Oliva, 2006).

El espermatozoide dispone de recursos limitados durante la fecundación, y a diferencia de las células somáticas o del ovocito, no cuenta con sistemas de reparación de daños del material genético. Por ello es esencial un elevado grado de compactación para la protección del material genético y la detención de la actividad transcripcional innecesaria (Kothari *et al.*, 2010). Las histonas no sustituidas por protaminas van a sufrir diferentes modificaciones (metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones o fosforilaciones) regulando la expresión del ADN no compactado, que permite la expresión de elementos necesarios en diferentes pasos de la espermatogénesis (Bonet y Mach, 2016). Durante este proceso de compactación, el cual se da mayoritariamente a lo largo del epidídimo (Seligman *et al.*, 1991), pueden darse múltiples anomalías que resulten en una incorrecta formación de los puentes disulfuro (Patankar y Parte, 2017).

También es importante conocer el proceso de capacitación espermática, el cual conlleva un conjunto de cambios bioquímicos y fisiológicos en los espermatozoides, imprescindibles para llevar a cabo la fecundación. Este proceso se da en el oviducto y engloba: una remodelación de la membrana plasmática (provocando la entrada de iones de calcio y bicarbonato, aumento del pH intracelular y la salida de colesterol, aumentando la fluidez y permeabilidad de la membrana); así como modificaciones en el acrosoma: (adquiriendo la capacidad de reconocer, unirse y penetrar la capa vitelina del ovocito), un aumento de los ROS intracelulares, y la inducción de la hiperactivación (Rodríguez-Almeida *et al.*, 2008; Zigo *et al.*, 2019).

1.5 Efectos adversos en el espermatozoide congelado

Tanto en la conservación mediante refrigeración como congelada, los cambios osmóticos y de temperatura afectan a la calidad de los espermatozoides (Pezo *et al.*, 2018), pero el procedimiento de criopreservación provoca modificaciones y daños adicionales en su estructura y fisiología, afectando directamente a la fertilidad. Algunas de estas alteraciones son:

- La composición de la membrana plasmática, especialmente la ratio fosfolípidos – colesterol y la abundancia de ácidos grasos saturados, son factores determinantes en la crio-tolerancia de los espermatozoides. En el cerdo, la membrana citoplasmática presenta una gran proporción de fosfolípidos insaturados, predisponiéndola a un shock por frío, desencadenándose una desestabilización y una pérdida de la permeabilidad selectiva (Yeste, Rodríguez-Gil y Bonet, 2017).
- La formación de pequeños cristales de hielo en los líquidos extracelulares, por una incorrecta adición o funcionamiento de los agentes citoprotectores, pueden causar pérdidas parciales o totales de los acrosomas, resultando en una expansión de la zona sub-acrosomal. Estos defectos junto con los daños provocados por los cambios osmóticos, generan daños en la estructura plasmática resultando en cambios morfológicos del espermatozoide.
- Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden ser la causa de una incorrecta compactación, al formar aductos con las hebras de ADN, que provocan fragmentación. Esto puede desembocar en una incorrecta unión de las protaminas alterando la formación de los puentes disulfuros, pudiéndose inducir la apoptosis (Amor *et al.*, 2019). A su vez,

los ROS presentan importantes funciones fisiológicas participando en la transducción de señales e interviniendo en la maduración, capacitación, hiperactivación, la reacción acrosomal y la fusión con el ovocito (Kothari *et al.*, 2010). Estos ROS pueden generarse tanto por vías exógenas: (elementos tóxicos del medio, dieta o radiaciones); como por vías endógenas: (leucocitos, espermatozoides inmaduros por la movilidad de los espermatozoides) (Amor *et al.*, 2019).

- La criopreservación causa modificaciones en la localización de las nucleoproteínas y desestabiliza los puentes disulfuro de las protaminas, alterando la compactación de la cromatina (Hezavehei *et al.*, 2018).
- Múltiples autores han sugerido cómo los efectos y daños causados por la criopreservación desembocan en cambios semejantes a los dados en la capacitación, denominándose capacitación prematura (crio-capacitación). Aunque los espermatozoides capacitados pueden llevar a cabo la fecundación, no se asocian a las células epiteliales en el istmo del oviducto y no establecen el reservorio espermático. Esto provoca una menor estancia en el aparato reproductor femenino y disminuye las tasas de fecundación (F. Rodríguez *et al.*, 2008; Vadnais y Althouse, 2011)

La inseminación llevada a cabo con estos espermatozoides alterados da como resultado menores tasas de fecundación y disminuciones en el número de partos, así como camadas más pequeñas frente a las obtenidas con semen conservado mediante refrigeración, conllevando pérdidas económicas (Garcia *et al.*, 2010). Se ha estimado que sólo un 2.5 % de los espermatozoides criopreservados presentan una funcionalidad completa (viabilidad, morfología, motilidad y capacidad de fecundación) tras pasar por el proceso de descongelación (Vadnais y Althouse, 2011).

1.6 Soluciones a la pérdida de viabilidad de las muestras espermáticas congeladas: plasma seminal

El plasma seminal (PS) está formado por un conjunto de elementos orgánicos e inorgánicos que, pese a no ser esencial en la fecundación, presenta un importante papel en la preservación, motilidad y transporte de los espermatozoides en los conductos reproductivos de la hembra. Esto es gracias a la presencia de proteínas y vesículas en el plasma seminal (Toragall *et al.*, 2019). El PS es generado a partir de las secreciones de múltiples glándulas secretoras en el

tracto genital de los machos, poseyendo unas características variables entre especies por la presencia y tamaño de diferentes glándulas accesorias (Recuero *et al.*, 2019).

Pese al conocimiento de la composición del plasma seminal, todavía se ignoran los mecanismos exactos que influyen en la fertilidad. La ausencia de protocolos estandarizados, así como las diferencias entre el plasma seminal recogido de diferentes especies, la variación entre individuos, eyaculados, volúmenes usados o las diferentes fracciones de un mismo eyaculado, complican las comparaciones entre diferentes estudios. Si se lograsen identificar los factores implicados en la mejora de la fertilidad de los espermatozoides contenidos en el plasma seminal, podrían añadirse en los extensores o agentes crioprotectores antes de realizar la congelación o tras la descongelación, permitiendo mejorar los programas de cría. De esta forma se mejoraría la eficiencia reproductiva y el control sanitario, evitando las pérdidas económicas asociadas (Recuero *et al.*, 2019; Lacalle *et al.*, 2021).

En diferentes estudios se ha demostrado cómo la adición de diferentes concentraciones de plasma seminal tras la descongelación permiten mejorar la calidad del semen (Fernández-Gago *et al.*, 2017; Recuero *et al.*, 2019). Esta mejoría se cree asociada a la restauración de algunos de los daños sufridos durante la criocongelación.

1.7 Investigaciones Previas

Para comprobar los efectos del plasma seminal en muestras espermáticas descongeladas, Fernández-Gago *et al.* (2013), llevaron a cabo un experimento en el cual se sometió muestras espermáticas congeladas de 7 cerdos de diferentes variedades, a diferentes concentraciones de plasma seminal (0 %, 10 % y 50 % PS) durante intervalos de tiempo de 0 h a 4 h. Se evaluaron los cambios en la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide, el estado del acrosoma y las mitocondrias, así como la concentración intracelular de calcio, ROS y la presencia de tioles extracelulares para la medición del estrés oxidativo. Este experimento permitió comprobar cómo la incubación con plasma seminal causaba una disminución en la integridad de la membrana y aumentaba el daño en el acrosoma. También se observó como la suplementación con 50 % PS incrementaba la fluidez de la membrana, así como los ROS y los tioles libres en la superficie celular tras las 2 h de incubación. Estos eventos beneficiaron el desempeño general de las muestras, a pesar de los efectos indeseables en las poblaciones más sensibles (especialmente provocados por los daños acrosomales).

En 2017 Fernández-Gago *et al.*, llevaron a cabo otro experimento con las muestras de los 7 cerdos anteriores, teniendo en cuenta que 3 de ellos eran susceptibles a sufrir alteraciones en la descongelación. Se analizó la movilidad y la estructura de la cromatina mediante los análisis CASA y SCSA, este último evaluado con citometría de flujo. La descongelación en ausencia del plasma seminal se tradujo en una gran pérdida de la movilidad, pero su aplicación permitió una conservación de mayores índices de movilidad, especialmente con 50% PS, donde se observaron tanto altos índices de movilidad, como menor cantidad de daño en la cromatina.

En ambos experimentos se evaluaron diferentes aspectos y cambios en la fisiología y estructura del espermatozoide tras la descongelación, pero no se realizó un análisis de las variaciones del número de puentes disulfuro asociados a la compactación por las protaminas. Este grado de compactación del material genético en la cabeza espermática es un parámetro utilizado directamente en otras especies como marcador de fertilidad (como en toro). Se fundamenta en que una correcta unión del ADN a las protaminas y los puentes entre ellas ayudan a evaluar el estado fisiológico del espermatozoide, permitiendo estimar la integridad y estabilidad nuclear permitiendo hacer predicciones sobre la capacidad de fecundación del espermatozoide. El parámetro de la compactación presenta una gran importancia en el funcionamiento del espermatozoide, regulando aspectos como la capacitación, la movilidad, la fecundación, la activación del ovocito y el posterior desarrollo del embrión (Pardede, Agil y Supriatna, 2020).

1.8 Monobromobimano (mBBr)

El monobromobimano (mBBr) (Figura 1) es una molécula utilizada para la detección de tioles libres presentes en las células. Estos grupos tioles están presentes en toda la célula, pero mayoritariamente en la cabeza espermática, donde van a formar parte de los puentes disulfuro entre las protaminas, quedando libres al romperse el enlace.

El mBBr es una molécula que no presenta fluorescencia hasta que se conjuga, presentando un máximo de absorción de 394 nm y emisión de 490 nm, siendo capaz de penetrar intacto en células vivas y reaccionar alquilando los grupos tioles libres (Thermofisher, 2021; Shalgi, Seligman y Kosower, 1989). Para disponer de un control interno de las muestras que indique el número de grupos tioles totales, se realiza una réplica aplicando ditioneitol (DTT). Este

compuesto reduce los puentes disulfuro, liberando los grupos tioles y permitiendo su conjugación con mBBr.

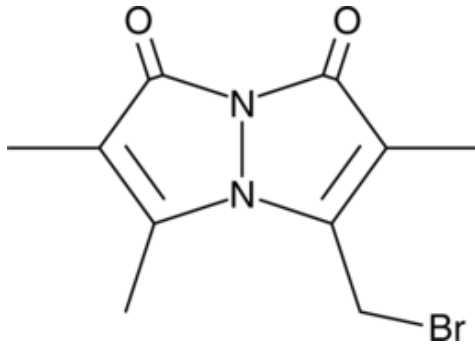


Figura 1. Estructura del monobromobimano (*Monobromobimane* (MBBr, NSC 608544, CAS Number: 71418-44-5) | Cayman Chemical, no date)

2 OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante citometría de flujo la eficacia del plasma seminal para la prevención o reducción de alteraciones producidas por la criopreservación sobre los puentes disulfuro de la cabeza espermática en espermatozoides porcinos, usando para ello diferentes concentraciones (0%, 10% y 50% PS), y tiempos de incubación (0 h, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h) con las muestras.

Como objetivo secundario de este experimento, se realizó un estudio de correlaciones con datos de análisis anteriormente realizados para expandir el entendimiento de los efectos del plasma seminal.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño experimental

El experimento se llevó a cabo con muestras seminales porcinas almacenadas en el laboratorio REPROBIO del Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL) de la Universidad de León (ULE). Estas muestras fueron obtenidas de 7 verracos sanos y fértiles. En los estudios previos, estas dosis seminales criopreservadas (-196 °C) se descongelaron e incubaron a 37 °C con 0 %, 10 % y 50 % de plasma seminal heterólogo (obtenido de diferentes machos), y se recogieron muestras a 0, 1, 2, 3 y 4 horas. Posteriormente se

almacenaron a - 80 °C. En estos experimentos se analizaron distintos parámetros por citometría de flujo, de los cuales se han utilizado en este trabajo los datos de fragmentación, viabilidad y cantidad de tioles extracelulares.

Utilizando las mismas muestras, de cada macho se obtuvo una réplica que se dividió en 2 alícuotas, una con ditioneitol (DTT) y otra sin DTT. Una vez añadidos los colorantes fluorescentes: yoduro de propidio (PI) y monobromobimano (mBBr) las muestras se analizaron mediante citometría de flujo.

3.2 Preparación de las muestras

3.2.1. Obtención de las muestras espermáticas y preservación

Las muestras espermáticas se obtuvieron de 7 cerdos de gran fertilidad (12 crías/parto): 3 de la variedad Landrace (LD) y de 4 de la variedad Large White (LW); entre 12 y 24 meses de edad. Estas muestras fueron obtenidas en el Centro Tecnológico de Inseminación artificial (Campo de Villavidel, León, España), mediante la técnica “Glove-hand” en la recogida rutinaria de semen. La concentración de los eyaculados se determinó mediante espectrometría, y la movilidad mediante determinación microscópica, descartando aquellas con una movilidad inferior al 60 %.

Inicialmente las muestras se diluyeron a 60×10^6 espermatozoides/ml, con diluyente MR-A (Kubus S.A., Madrid, España) a 32,5 °C. Tras 1 h a temperatura ambiente y 3 h a 15 °C, se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación ($800 \times g$, 10 min a 15 °C). El precipitado se resuspendió en una dilución lactosa-yema de huevo hasta una concentración final de 15×10^9 espermatozoides/ml. Durante las 2 h posteriores las muestras se mantuvieron a 5 °C durante las que se adicionó el agente crioprotector, compuesto por un 89,55 % de dilución lactosa-yema de huevo, 8,95 % (vol/vol) de Glicerol y 1,5 % (vol/vol) Equex STM (Minitube, Alemania). Para la obtención final de una concentración de 3 % de glicerol, se añadió en proporción de 2 muestra : 1 crioprotector, resultando en una concentración final de 1×10^9 espermatozoides/ml. Finalmente, se introdujo en pajuelas de 0.25 ml a 5 °C y, en una cámara congeladora programable (Ice Cube 1810, Sy-Lab, Purkersdorf, Australia), se enfriaron a una velocidad de 3 °C/min, de 5 °C a -6 °C, manteniendo 1 minuto adicional para la cristalización; y a 20 °C/min, desde los -6 °C a -100 °C. Finalmente las muestras se sumergieron en nitrógeno líquido (-196 °C) y se almacenaron en el criobanco.

3.2.2 Preparación del plasma seminal

Se obtuvo a partir de muestras de 11 verracos (variedades Duroc, Landrace y Large White), con las que se realizó un pool de eyaculado. Este fue sometido a una doble centrifugación ($800 \times g$, 10 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) permitiendo recoger el plasma seminal del sobrenadante que fue almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3 Incubación de las muestras en plasma seminal

El proceso de descongelación del plasma se realizó en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se distribuyeron en tubos de 1,5 ml y fueron diluidas con MR-A hasta una concentración de 25×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras se suplementaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 0 %, 10 %, o 50 % del plasma seminal heterólogo previamente descongelado. Se recogieron muestras a las 0, 1, 2, 3, y 4 horas, de las cuales se tomaron y mezclaron alícuotas con diferentes fluorocromos específicos.

3.3 Análisis previos de las muestras

Fernández-Gago *et al.* (2013) y (2017) llevaron a cabo experimentos sobre las mismas muestras mediante análisis SCSA (fragmentación y compactación de la cromatina), análisis de ROS (cantidad de ROS intracelulares y viabilidad) y análisis con 5-IAF (cantidad de tioles libres en la superficie celular).

SCSA

Se utilizó el fluorocromo naranja de acridina, capaz de insertarse y asociarse a ADN bicatenario o monocatenario, emitiendo fluorescencia en el verde o en el rojo respectivamente, analizada por citometría (Didion *et al.*, 2009). Al realizar la relación entre [fluorescencia roja / fluorescencia total], se obtiene el índice de fragmentación del ADN (DFI), a partir del cual se clasifican los eventos que presenten valores de DFI medios (Moderado-DFI) y valores de DFI alto (Alto-DFI). La suma de estos 2 valores permite la obtención de % DFI. A partir del DFI también extraen los valores medios de intensidades de las muestras (\bar{x} -DFI) y las desviaciones estándar del DFI (SD-DFI), esta última permitiendo medir el grado de anormalidad de las muestras. Finalmente, a partir del SCSA también se obtiene el % HDS (High DNA Stainability), parámetro que indica el porcentaje de eventos con fluorescencia verde aumentada, emitida por el ADN bicatenario, indicando el grado de descompactación de la cromatina espermática (Evenson, Larson y Jost, 2002; Evenson, 2016).

ROS intracelulares

Se utilizó el compuesto CM-H₂DCFDA, el cual es oxidado por los ROS a diclorofluoresceína, emitiendo fluorescencia a 517–527nm. En conjunto con el fluorocromo PI, se seleccionaron las células viables (PI -) y se determinó el MFI de la diclorofluoresceína.

5-IAF

Los tioles libres de la superficie celular se evaluaron por tinción con 5-IAF con citometría de flujo. Los resultados se obtuvieron calculando el MFI tras la exclusión de los eventos PI+, (muertos).

3.4 Análisis de los puentes disulfuro

Para el análisis de los puentes disulfuro con mBBr, se descongeló una réplica de cada muestra espermática de cada macho en el baño de agua a 37 °C durante 30 segundos, y se separaron en 2 placas de 96 pocillos: la placa C (placa Control, no tratada con DTT): con 100 µl de muestra por pocillo; y la placa D (con tratamiento de DTT): con 140 µl de muestra por pocillo. El DTT se utiliza para la ruptura de todos los puentes disulfuro de las muestras, al restar la fluorescencia del mBBr de esta placa con la fluorescencia de la placa sin DTT, se obtiene el número de puentes disulfuro presentes en la célula. En ambas placas se incluyó un pocillo con 200 µl de estándar de cerdo, una muestra con una concentración y calidad espermática previamente conocidas. Todo el procedimiento se realizó manteniendo las placas con las muestras espermáticas en hielo.

La placa D se centrifugó (1000 × g, 11min), y tras eliminar el sobrenadante, se adicionaron 100 µl de DTT (1 mM) a cada pocillo en campana extractora. Se incubó a 37 °C en estufa durante 10 minutos. A continuación, se adicionaron 100 µl de PBS a ambas placas para realizar un lavado y se centrifugaron (1000 × g, 11min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron los pocillos con 100 µl de mBBr (500 mM). Se incubaron 10 minutos a 37 °C en estufa, se añadieron 100 µl a todos los pocillos para lavar los restos de mBBr y se centrifugó (1000 × g, 11min).

Finalmente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 250 µl de PI (1,9 µM), un fluorocromo de contraste que emite en el rojo (636 nm). Esta molécula es capaz de introducirse en las células no viables, que presentan la membrana plasmática dañada. En este

caso fue utilizado a altas concentraciones, penetrando en todas las células para su distinción de la suciedad presente en el plasma seminal.

Se almacenaron en cámara fría a 4 °C y se realizó la lectura 24 horas después en el citómetro MACSQuant Analyzer 10.

3.5 Análisis espermático mediante citometría

Utilizando el citómetro MACSQuant Analyzer 10 (Figura 2. A) se estudiaron los diferentes eventos de cada muestra, cribándose gracias a una plantilla previamente diseñada. Esta permitió la separación con el forward scatter (FSC) y side scatter (SSC) los eventos con tamaño y complejidad más semejantes a los característicos de espermatozoides estándar (Figura 2B. Región B1). Posteriormente se discriminó una mayor cantidad de suciedad y células dañadas mediante la fluorescencia emitida por el fluorocromo de contraste PI, capaz de atravesar la membrana plasmática de todas las células a altas concentraciones, tiñendo el ADN (Figura 2B. Región B2). La fluorescencia de los eventos seleccionados es la que finalmente se utiliza en el análisis (Figura 2B. Región B3).

La tinción con mBBr permite la cuantificación de los tioles libres, los totales y la cantidad de puentes disulfuro en el núcleo espermático. Para realizar las comparaciones entre muestras y tratamientos se calculó la media de la intensidad de la fluorescencia (MFI: Mean Fluorescence Intensity), la cual se obtuvo mediante la resta de los tioles libres (placa C) menos los tioles totales (placa D) y dividido entre 2 (Zubkova, Wade y Robaire, 2005)

Las células finalmente se dividieron en función de su MFI en 3 regiones mediante varios umbrales (Figura 2. D):

- Región mBBr Bajo (Figura 2. D1): se englobaron las intensidades obtenidas a partir de espermatozoides con muy poca presencia de grupos tioles libres (SH-) y una gran cantidad de puentes disulfuro (S-S), por lo tanto, pudiendo presentar un estado óptimo gracias a la correcta compactación.
- Región mBBr moderada (Figura 2. D2): células con MFI moderados [0,4, 2,5]. En esta zona se encuentran las líneas roja y azul solapadas, indicando la media del MFI de los espermatozoides respectivamente.

- Región mBBr alto (Figura 2. D3) se encuentran las emisiones de MFI que superaban el umbral superior, emitidas por espermatozoides con la cromatina altamente descompactada, presentando un gran número de grupos tioles libres (SH-) y un menor número de puentes disulfuro (S-S).

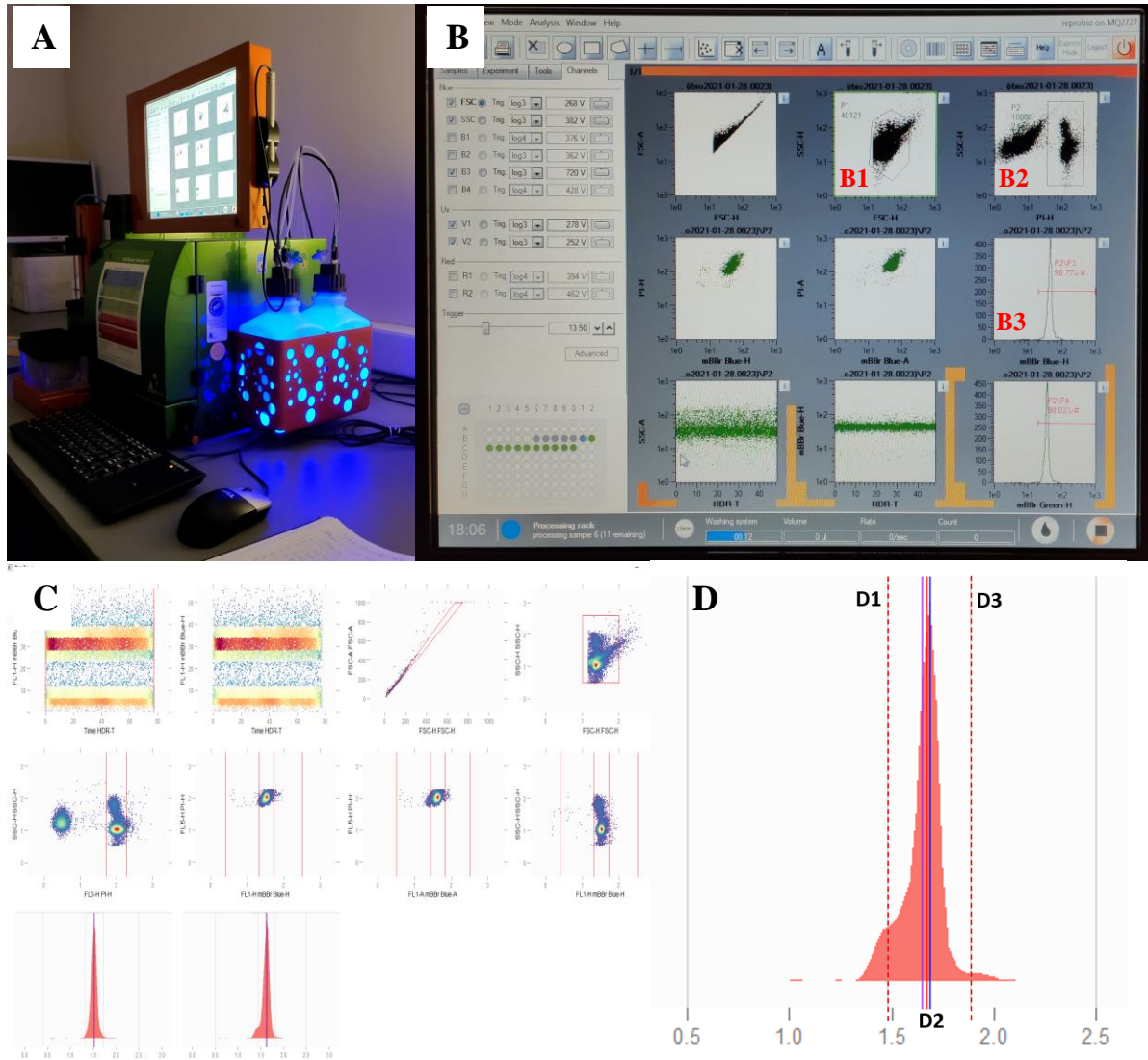


Figura 2. (A) MACSQuant Analyzer 10. (B) Lectura de una muestra en el citrómetro. Se pueden observar la selección de eventos por su FSC y SSC (B1), así como la discriminación por su emisión de PI (B2) y el pico de fluorescencia de mBBr de los eventos seleccionados previamente en los *gates* (B3). (C) Análisis de la muestra en R-Studio, donde los eventos se vuelven a filtrar y se hace una separación más precisa de los eventos seleccionados por mBBr, dividiendo el pico en 3 regiones: “mBBr Bajo” (D1), “mBBr moderado” (D2) y “mBBr alto” D3).

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron y analizaron con el paquete estadístico R versión 4.1. Para su análisis se realizó una estadística multinivel, con efectos fijos de concentración de plasma seminal y tiempo de incubación; y efectos aleatorios. Se utilizaron modelos lineales de efectos mixtos (LME) para determinar la presencia de efectos significativos. Los resultados se muestran tanto en porcentajes eventos (espermatozoides) +/- desviación estándar o en formato de la intensidad media de la fluorescencia (MFI: Mean Fluorescence Intensity) +/- desviación estándar.

Para establecer las correlaciones entre los datos experimentales obtenidos de mBBR con los datos obtenidos de otros análisis, se realizó un análisis de correlaciones lineales de Pearson, obteniendo tanto el índice de correlación r como la significación de la correlación.

4 Resultados

4.1 Análisis de la fisiología y de la cromatina espermática

A continuación, se muestran los análisis previos realizados sobre las muestras en los que se estudió la fragmentación y compactación de la cromatina (SCSA), la cantidad de ROS intracelulares y viabilidad de los espermatozoides, así como cantidad de tioles libres en la superficie celular (análisis 5-IAF).

Análisis SCSA (fragmentación):

Los análisis mediante SCSA mostraron cómo los espermatozoides con fragmentación de las hebras moderada o alta (% DFI) (Figura 3. C), disminuyeron de forma significativa ($P < 0,001$) al utilizar las concentraciones de 10 % o 50 % de plasma seminal. Entre ambos tratamientos (10 % o 50 % PS) no se mostraron diferencias significativas, pero visualmente la gráfica muestra como la aplicación de 50 % de plasma seminal genera una mayor disminución de los niveles de fragmentación.

El porcentaje de espermatozoides con alto % DFI (Figura 3. E) (correspondiente a espermatozoides que superan un umbral de alta fragmentación), no siguieron la tendencia previa, ya que la aplicación de 10 % y 50 % sí presentaron una disminución significativa frente a 0 %, pero en este parámetro la aplicación de 10 % de plasma seminal es la que presentó una mayor reducción de la fragmentación.

El último parámetro analizado con SCSA, el % HDS (Figura 3. F), el cual indica el porcentaje de espermatozoides con inmadurez de la cromatina, mostró de nuevo como la utilización de 10 % o 50 % de plasma seminal causaba una reducción significativa del porcentaje de espermatozoides inmaduros, mejorando de nuevo la calidad espermática, siendo 50 % PS más eficaz, sin que se diesen diferencias significativas entre los tiempos de incubación.

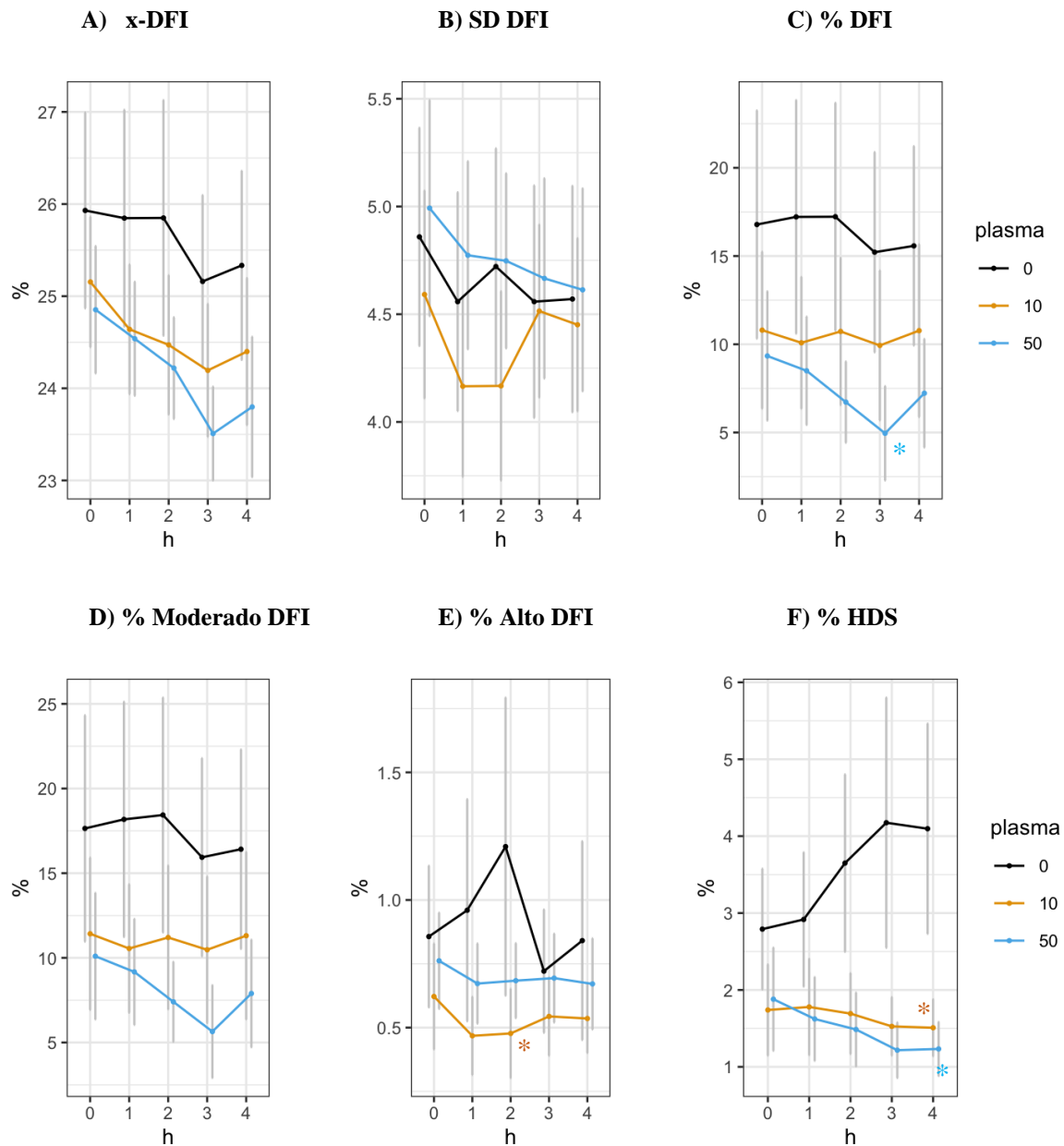


Figura 3. Resultados del análisis de SCSA ya realizado sobre las muestras, aportándonos: **(A)** [x-DFI] valores medios del DFI; **(B)** [SD-DFI] desviación estándar del DFI; **(C)** [% DFI] porcentaje de espermatozoides con fragmentación nuclear moderada o alta, el asterisco (*) indica la diferencia significativa ($P < 0,001$) de la aplicación de 50 % PS; **(D)** [moderado DFI], porcentaje de espermatozoides con fragmentación moderada; **(E)**

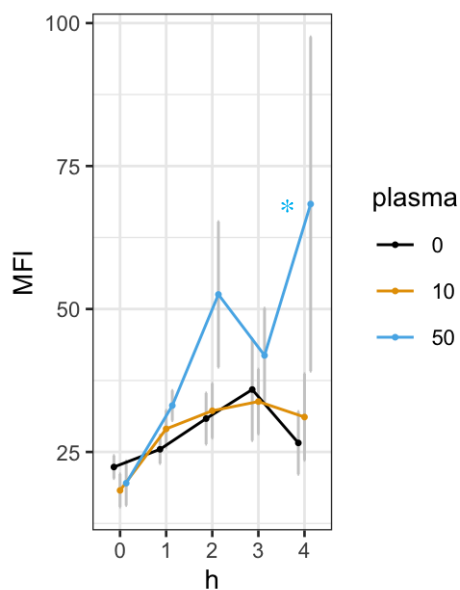
[alto DFI]; porcentaje de espermatozoides con fragmentación alta, el asterisco (*) indica la diferencia significativa ($P < 0,001$) de la aplicación de 10 % PS; y (F) [% HDS] porcentaje de espermatozoides con un alto grado de descompactación de la cromatina espermática, el asterisco (*) indica la diferencia significativa ($P < 0,001$) de la aplicación de 50 % y 10% PS frente a 0 %.

Análisis de viabilidad:

En el estudio de las especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelulares mediante CM-H₂DCFDA (Figura 4. A), se observó un aumento de la concentración de ROS durante las 2 primeras horas de incubación con 10 % y 50 % de plasma seminal.

Se pudo observar como el tratamiento con 50 % de plasma seminal, el cual produjo una mayor cantidad de ROS a lo largo del tiempo frente a 0 % PS y 10 % PS, es el tratamiento que generó una mayor pérdida de viabilidad a lo largo del tiempo. El tratamiento con 10 % de plasma seminal no presentaba una generación de ROS significativa frente a 0 % de plasma seminal, lo que se traduce en que en la pérdida de viabilidad causada por ROS no haya diferencias significativas entre el tratamiento con una concentración de 0 % o 10 %.

A) Media fluorescencia CM-H₂DCFDA ROS



B) Viabilidad

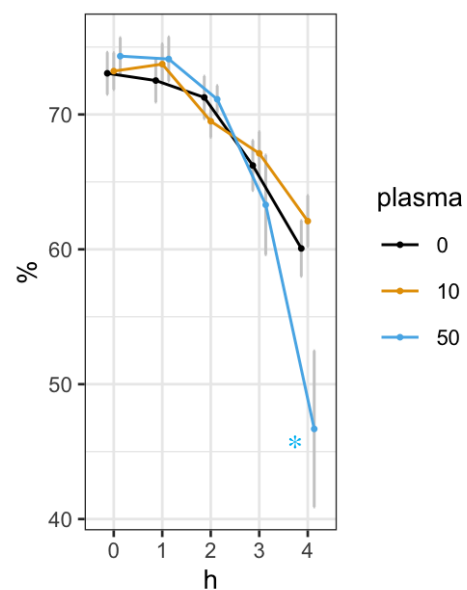


Figura 4. Resultados de experimentos previos de la concentración de ROS intracelulares mediante el análisis con CM-H₂DCFDA en función de la concentración de plasma seminal y el tiempo. (A) Media de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína al interactuar con ROS y (B) Viabilidad espermática al comparar la intensidad de CM-H₂DCFDA con la intensidad de PI. Mediante asteriscos (*) se señalan las diferencias significativas más relevantes al aplicar 50 % PS ($P < 0.001$), indicando el aumento de ROS y la disminución de viabilidad.

4.2 Resultados del mBBr mediante citometría de flujo

Para comprobar el efecto del plasma seminal sobre la estructura y estabilidad de la cromatina del espermatozoide, se realizó el protocolo con mBBr y se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5 y en la Figura 6.

Análisis de las regiones de intensidad de fluorescencia del mBBr:

Como se mencionó previamente, las muestras se dividieron en 3 poblaciones distintas en función de la intensidad de la fluorescencia emitida por el mBBr (baja, moderada y alta) en las que se pudo observó cómo:

- El porcentaje de espermatozoides clasificados con baja fluorescencia (Figura 5. A), donde se encuentran los espermatozoides con cromatina altamente estabilizada por puentes disulfuro, la presencia de 50 % plasma seminal (50 % PS) provocó un incremento significativo del % de espermatozoides en las 0 h y 1 h de tratamiento. Pero también causó una gran disminución del % de células en las 2 h y 3 h de tratamiento, presentando cantidades por debajo de las muestras tratadas con 0 % PS. Se observó como el tratamiento con diferentes concentraciones de PS es significativo en los espermatozoides con la cromatina más estable, pero no el del tiempo de incubación.
- En el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia de mBBr moderada (Figura 5. B), la aplicación de 50 % de plasma seminal mostró una dinámica inversa a la vista en los espermatozoides con baja fluorescencia. Inicialmente se observó un menor porcentaje de espermatozoides que los tratamientos de 0 % y 10 % en las 0 h y 1 h, que posteriormente mostró un gran aumento del % de células en las 2 h y 3 h de tratamiento.
- Finalmente, el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia alta (Figura 5. C), donde se encuentran aquellos con una gran cantidad de grupos tioles libres, indicando alto grado de daño, se observó como el porcentaje de espermatozoides se redujo de manera significativa al utilizar un y 50 % de plasma seminal ($P < 0,001$) frente a la incubación sin plasma seminal (0 % PS) o con 10 % PS. En este % de espermatozoides más dañados, se observó claramente como un mayor tiempo de incubación resultó en una disminución significativa del % de células, especialmente al incubar las muestras durante 1 h o 4 h, lo que indica un mayor restablecimiento de los puentes disulfuro.

A) Fluorescencia mBBr baja B) Fluorescencia mBBr moderada C) Fluorescencia mBBr alta

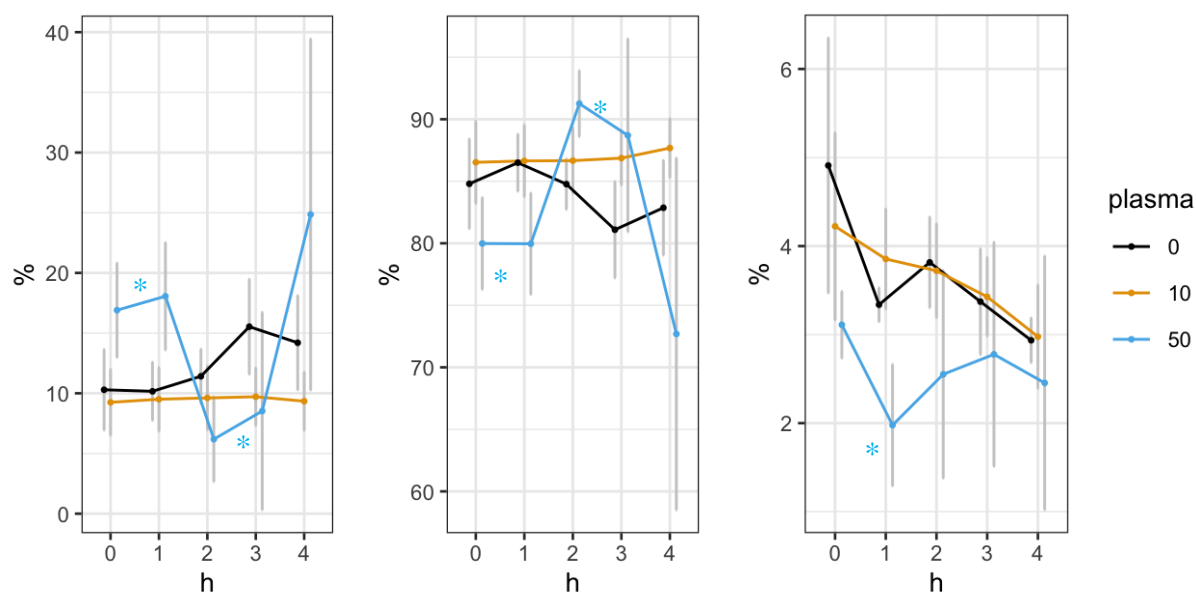


Figura 5. Las gráficas muestran las dinámicas de las poblaciones de espermatozoides con fluorescencia mBBr baja (A), moderada (B) y alta (C) tras haber sido tratadas con 0 %, 10 % y 50 % de PS entre 0 h y 4 h. Los datos se representan como % espermatozoides a lo largo de las horas de incubación, indicándose con asteriscos (*) el desplazamiento causado por el 50 % PS sobre las poblaciones con intensidades de mBBr bajo (A) y moderado (B), así como la mejoría sobre los espermatozoides con intensidad alta (C).

Análisis de las intensidades mBBr y puentes disulfuro:

Se observó como la media de intensidad de la fluorescencia de mBBr sin DTT (Figura 6. A), al adicionar 50 % de plasma seminal sufrió un descenso significativo ($P < 0,001$) del número de tioles detectados frente a 10 % y 0 %. Esto indica que la presencia de plasma seminal disminuye la cantidad de grupos tioles libres (SH-), aumentando la presencia de puentes disulfuro y por lo tanto mejorando la calidad de los espermatozoides criopreservados. Pero para comprobar si esto es cierto, se debe comparar frente al procedimiento con DTT en la cantidad total de puentes disulfuro.

En la gráfica con la cantidad relativa de puentes disulfuro (Figura 6. C) se muestra un aumento significativo entre el tratamiento con 10 % y 50 % de plasma seminal, frente al tratamiento sin plasma seminal (0 % PS). La incubación con 50 % de plasma seminal presentó un aumento altamente significativo ($P < 0,001$) frente a los otros 2 tratamientos, indicando una mayor recuperación y por lo tanto una mayor estabilidad de la cromatina espermática. En cambio, la aplicación de 10 % de plasma seminal ejerció un efecto de mejora similar a 50 %,

pero en ocasiones no presenta diferencias significativas frente a la ausencia de plasma seminal.

También se debe destacar como un mayor tiempo de incubación en los 3 tratamientos, se tradujo en un aumento de puentes disulfuro prácticamente lineal, produciéndose un incremento significativo del número de puentes disulfuro a mayor tiempo de incubación.

Como conclusión del análisis con mBBr, la aplicación de 50 % de plasma seminal redujo el número de espermatozoides con altos niveles de fluorescencia (altamente descompactados), aumentándose el número de espermatozoides con una cromatina más estable (intensidades de mBBr moderadas y bajas), correspondido con la dismunución de grupos tioles libres y el incremento del número relativo de puentes disulfuro.

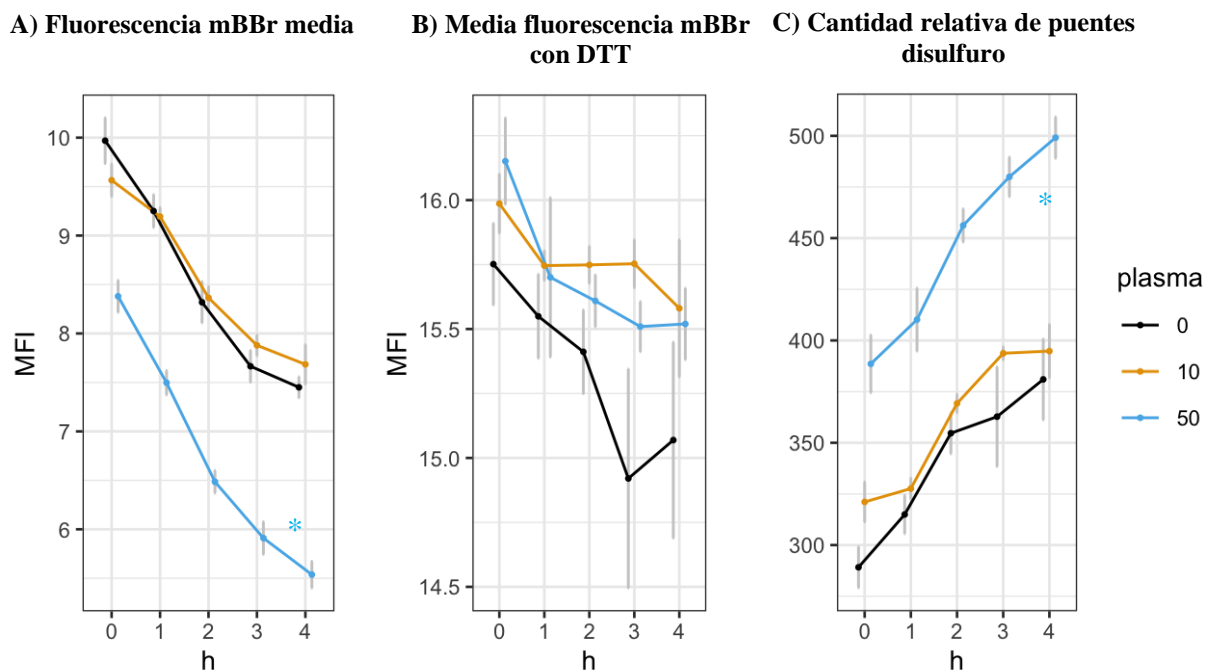


Figura 6. Datos obtenidos del estudio de mBBr sobre las muestras tratadas con 0 %, 10 % y 50 % de PS a lo largo del tiempo. **(A)** La Fluorescencia mBBr media, representa la MFI de las muestras tratadas únicamente con mBBr, **(B)** muestra el MFI de mBBr de las muestras tratadas con DTT; y **(C)** presenta el MFI relativo de mBBr multiplicada por 1000, correspondiente a los puentes de sulfuro presentes en las células obtenidos tras realizar la resta entre el número detectados en las muestras tratadas con y sin DTT. Los asteriscos (*) señalan la disminución significativa ($P < 0,001$) en la intensidad de mBBr media (A) y el aumento significativo ($P < 0,001$) de la cantidad relativa de puentes disulfuro (C).

4.3 Análisis de correlaciones de los resultados

Con los datos obtenidos en el estudio de mBBr, SCSA, ROS intracelulares y el análisis de tioles libres de superficie se realizó un análisis de correlaciones de los diferentes parámetros (Figura 7).

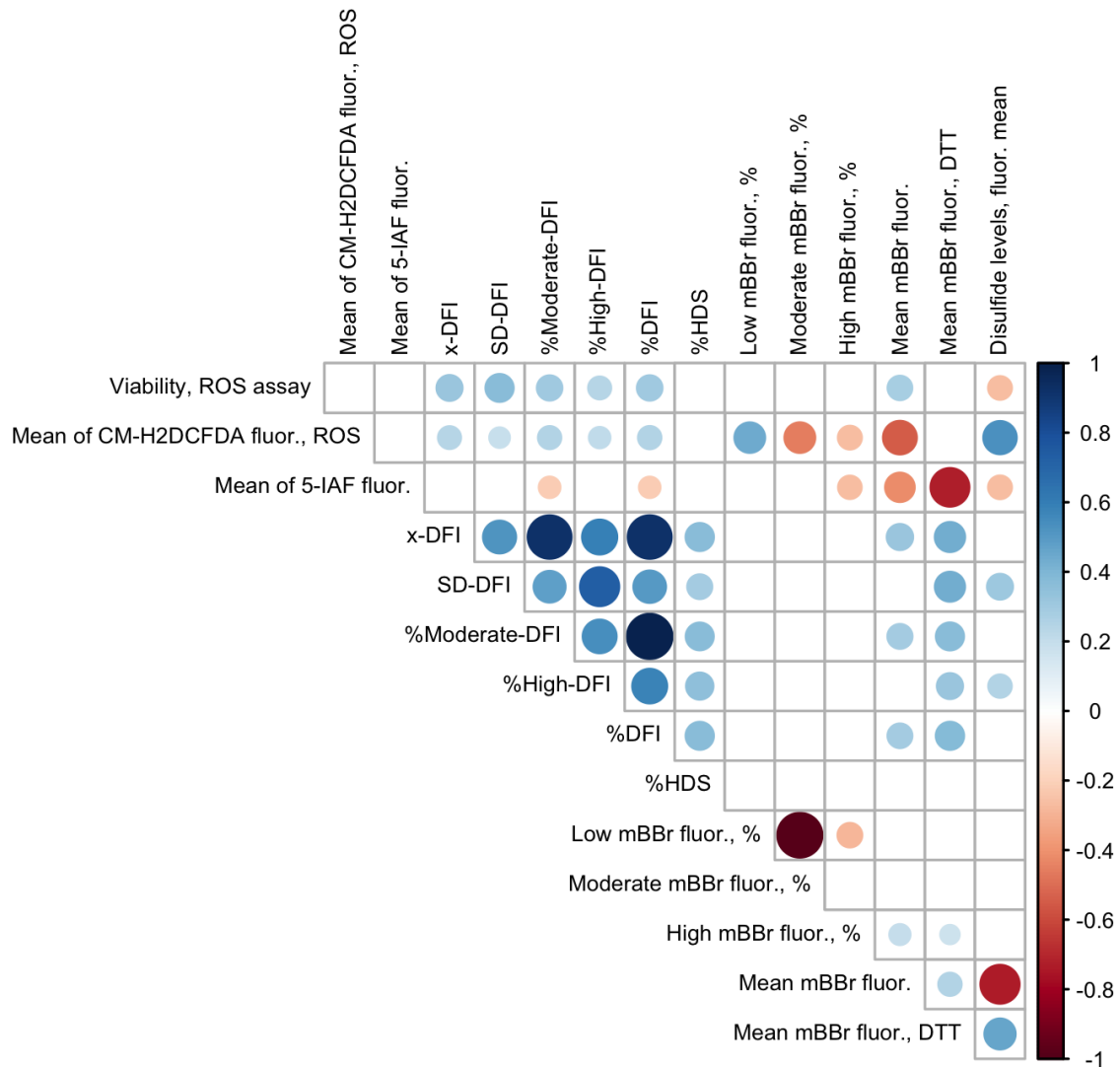


Figura 7. Diagrama de correlaciones lineales por el método Pearson con las variables más representativas de los análisis de mBBr, SCSA y ROS. Los puntos representan el coeficiente de correlación (r) entre las dos variables mostrándose los que presentan un $P < 0,01$, cuyo color y tamaño varía en función del valor de r como se muestra en la leyenda.

Se obtuvo una gran cantidad de correlaciones entre los diferentes parámetros de los diferentes análisis (Figura 7). Por ello, se estableció el umbral de p -valor inferior a 0,001 para evitar errores tipo I y se analizaron las correlaciones con un r superior a 0,4. No obstante, es interesante que se obtuviesen tantas correlaciones entre diferentes técnicas.

Comenzando con el análisis de viabilidad y cantidad de ROS intracelulares, se observaron correlaciones positivas entre la cantidad de ROS intracelulares con el porcentaje de espermatozoides altamente estables (Fluorescencia mBBr baja, $r = 0,44$) y con la cantidad de puentes disulfuros en la célula ($r = 0,53$). A su vez, también se dieron correlaciones negativas frente al porcentaje de espermatozoides de la región de intensidad moderada (Fluorescencia mBBr moderada, $r = - 0,44$) y frente a la intensidad de los grupos tioles libres sin tratamiento de DTT (Fluorescencia mBBr media, $r = - 0,54$). Estas correlaciones podrían ser causadas por un restablecimiento de los puentes disulfuro en entornos oxidativos, causando un desplazamiento del porcentaje de espermatozoides situados en la región de intensidad moderada a la región de intensidad baja, indicando un incremento en la estabilidad.

En el análisis de viabilidad frente a mBBr se observaron correlaciones positivas, pero con valores de r muy bajos. Un ejemplo de ello es la correlación entre la viabilidad y la cantidad de puentes disulfuros presentes en las células ($r = 0,28$), pudiendo indicar una asociación causa - efecto de cómo la cantidad de puentes disulfuro en la cabeza espermática, puede aumentar la viabilidad.

La fluorescencia de 5-IAF, producida por los tioles libres situados no en el interior de la célula, sino en la superficie de membrana, presentó correlaciones negativas con la intensidad del mBBr emitida por los grupos tioles libres sin DTT ($r = - 0,41$) y con DTT ($r = - 0,72$). La primera correlación podría indicar como una mayor cantidad de puentes disulfuro (asociada a la disminución de mBBr sin DTT), provoca una mayor cantidad de grupos tioles libres extracelulares, posiblemente causados por la liberación de los ROS intracelulares generados en la restauración de los puentes disulfuro. En cambio, la segunda correlación (tioles libres en el exterior celular – mBBr con DTT), presenta un p -valor de 0, indicando que, pese a la presencia de una correlación muy elevada, puede haberse dado por azar y no se debe tener en cuenta.

Finalmente, se observaron diferentes correlaciones de las variables del análisis SCSA, con el análisis de mBBr. Pese a verse diez correlaciones con el margen de 0,01, únicamente 2 de ellas muestran un valor de r superior a 0,4. Estas son la media de intensidades de fragmentación (x-DFI) y la variación de las intensidades (SD-DFI), frente a la intensidad de fluorescencia emitida por el mBBr con tratamiento de DTT. También se observa las correlaciones con un p -valor altamente significativo, pero con un R inferior a 0,4, de m-DFI ($r = 0,38$) y % DFI ($r = 0,38$) con la media de la intensidad de mBBr sin DTT. Esto se debe a que

en las muestras tratadas con DTT, la rotura de los puentes va a causar desestabilización y fragmentación del material genético, incrementando la x-DFI y la dispersión y variabilidad de los datos.

5 Discusión

El empleo de semen criopreservado en la industria porcina es muy reducido, debido a sus menores tasas de fertilidad y su elevado coste (Lacalle *et al.*, 2021). Es necesario mejorar los procedimientos de congelación del semen, debido a que los espermatozoides porcinos son altamente susceptibles a estrés oxidativo y shock por frío causados en el proceso de congelación (Yeste, Rodríguez-Gil y Bonet, 2017). Algunos de estos daños van a afectar a la estructura nuclear, provocando roturas de los puentes disulfuro entre protaminas que compactan el material genético. En múltiples estudios se ha comprobado como la presencia de plasma seminal (PS) modifica la estructura de la membrana plasmática, regula la movilidad y el metabolismo, permitiendo así revertir algunos efectos de la crio-capacitación (Lacalle *et al.*, 2021). Por ello, el objetivo de este estudio era comprobar los efectos de la incubación con diferentes concentraciones de plasma seminal en muestras espermáticas descongeladas, evaluando la compactación de la cromatina espermática mediante la cuantificación de los puentes disulfuros presentes entre las protaminas. Estos resultados se cruzaron con los obtenidos en experimentos anteriores en busca de correlaciones para ayudar a entender los beneficios que puede aportar su utilización.

Para la cuantificación de los puentes disulfuro, se utilizó el marcaje con mBBr, el cual se conjuga con los grupos sulfhidrilos libres (SH-) que conforman los puentes disulfuro. La incubación con 50 % de plasma seminal (50 % PS) mostró un gran incremento en el número relativo de puentes disulfuros (S-S) (Figura 6. C), con incrementos de hasta un 30 %, disminuyendo en gran medida los espermatozoides con mayor descompactación (Fluorescencia mBBr alta, Figura 3. C). La formación de puentes disulfuro entre protaminas, se dan bajo condiciones ligeramente oxidativas en la maduración del espermatozoide (Kothari *et al.*, 2010). Por ello, se plantea la hipótesis de que el incremento intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) al incubar con plasma seminal visto en este estudio (Figura 4.A), permite una restauración de los puentes disulfuro, hipótesis respaldada por la correlación obtenida entre la cantidad relativa de puentes disulfuro y la cantidad de ROS intracelulares ($r = 0,54$) (Figura 6. A). Este incremento de ROS, se cree que es originado por una activación del metabolismo, causado por la presencia de proteínas específicas en el plasma seminal,

especialmente por las espermadesinas PSP-I/PSP-II, las cuales son capaces de preservar *in vitro* la viabilidad, motilidad y actividad mitocondrial de los espermatozoides revertiendo la criocapacitación (Recuero *et al.*, 2019).

La adición de 50 % de plasma seminal permitió la restauración de los puentes disulfuro, pero también se observó cómo su aplicación llevó alteraciones asociadas. En la figura 5.A (Espermatozoides con muy buena compactación según la intensidad del mBBr), la aplicación de este 50 % de plasma seminal provocó daños en un 10 % de los espermatozoides en la 2 y 3 h de incubación, desplazándose a la región de compactación moderada (Figura 5.B). Esta disminución de la estabilidad nuclear pudo ser causada por el incremento de ROS intracelulares. A parte de participar en diferentes aspectos fisiológicos del espermatozoide de forma favorable, pueden provocar ruptura de mitocondrias, peroxidación de lípidos de la membrana, apoptosis y daños en el ADN, posiblemente a grandes concentraciones. Esto puede afectar a las poblaciones de espermatozoides más sensibles o con alteraciones previas (Hezavehei *et al.*, 2018), pudiendo ser la causa de esta disminución de un 10 % de los espermatozoides más estables.

La incubación con 50% de plasma seminal no solo supuso un incremento en el número de puentes disulfuro y ROS intracelulares, sino que también causó una gran disminución de la viabilidad (Figura 4. B), especialmente en la 4 h. El análisis estadístico mostró bajos índices de correlación entre estos parámetros (incremento ROS – puentes disulfuros, $r = 0.04$), (viabilidad – cantidad puentes disulfuros, $r = - 0,26$), indicando como el aumento de la cantidad de puentes disulfuro en la célula no está directamente relacionado con un aumento en la viabilidad. En algunos espermatozoides el aumento de puentes disulfuro mejorará su compactación y su capacidad de fecundación, pero en otros, el plasma seminal causará más alteraciones que beneficios. El equilibrio entre la mejora aportada por el restablecimiento de los puentes disulfuro, y los daños por el incremento de ROS intracelulares, se podría lograr realizando un estudio con un mayor número de concentraciones y menores intervalos de tiempo, para la optimización de los valores en su posible aplicación en producción.

Otras alteraciones causadas por la aplicación de un 50% de plasma seminal, son las observadas por Fernández-Gago *et al.* (2013). Que en su estudio, realizado con las mismas muestras, mostraron el incremento en la fluidez de la membrana como principal cambio morfológico sufridos por el espermatozoide al ser incubado con 50 % PS. Esta mayor fluidez pudo causar un aumento en permeabilidad y la desorganización de la membrana de los

espermatozoides, permitiendo la difusión de componentes del medio (como Ca^{2+} o bicarbonato), desregulándose la homeostasis espermática e induciendo la degradación de proteínas y mRNAs, como se cree que ocurre en el proceso de criopreservación (Yeste, Rodríguez-Gil y Bonet, 2017). Este efecto de desestabilización de la membrana podría ser la causa de la gran variación entre muestras en la 4 h de tratamiento, así como ser contribuir al aumento de ROS intracelulares y a la pérdida de viabilidad. Adicionalmente, esta desestabilización y gran aumento de ROS podrían ser la causa de la descompactación de un 10 % de espermatozoides que presentaban cromatina altamente estable y han pasado a presentar daños moderados.

En cuanto a la aplicación de 10 % de plasma seminal (10 % PS) en vez de 50 %, se observaron mejoras significativas ($P < 0,001$) en el número de puentes disulfuro y en el número de espermatozoides con compactación moderada de la cromatina (Figura 5. B), sin acercarse a los valores de 50 %, pero mostrando menores pérdidas de viabilidad. Esta mejora contrasta con las evidencias de otros estudios, donde la recuperación de otros daños sufridos por el espermatozoide no eran tan significativos con la aplicación de 10 % PS, presentando una menor recuperación (Vadnais *et al.*, 2005; Fernández-Gago, Domínguez y Martínez-Pastor, 2013). Este cambio en la efectividad pudo deberse al estado de las muestras o las diferencias entre los plasmas seminales utilizados.

En cuanto a los puentes disulfuro libres presentes en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide, Fernández-Gago *et al.* (2013) destacó la ausencia de un incremento con la presencia de plasma seminal. A diferencia de la elevación de puentes disulfuro observada en el núcleo, se cree que esta falta de formación en el exterior celular es causado por la presencia de grandes cantidades de sustancias antioxidantes en el PS, las cuales ayudan a conservar los espermatozoides pero evita el restablecimiento de los puentes en la superficie celular.

Los eyaculados de cerdos se dividen en varias fracciones en función de la cantidad de espermatozoides y la composición del plasma seminal. En múltiples estudios se ha observado cómo los espermatozoides pertenecientes a la fracción retenida del eyaculado presentan una mayor resistencia a la criopresevación (Peña *et al.*, 2003; Alkmin *et al.*, 2014), así como la adicción de esta misma fracción específica de plasma seminal, tiene efectos beneficiosos sobre la ultraestructura de membrana y la motilidad de los espermatozoides. Este hecho se cree que es causado por las variaciones en la composición de las diferentes fracciones del

eyaculado (Ramírez-Vasquez *et al.*, 2019), con concentraciones de proteínas y antioxidantes diferentes entre dichas fracciones.

Se debe tener en cuenta que, en la elaboración de este estudio, se utilizó un pool de PS de diferentes individuos y diferentes razas. Algunos autores proponen la separación entre plasmas seminales de cerdos “good freezer” y “bad freezer”, ya que un plasma seminal “good freezer” permite obtener mayores tasas de movilidad y mayor capacidad de penetración del óvulo tras su adición post-descongelación, (Hernández *et al.*, 2007). Este elemento de variabilidad se podría tener en cuenta para futuras investigaciones.

La adición de plasma seminal o proteínas del SP, antes o después de la congelación, muestran resultados contradictorios sobre la calidad del semen y la fertilidad. Ramírez-Vasquez *et al.*, (2019) llevaron a cabo un estudio para determinar si estos resultados contradictorios podían ser causados por la interacción del plasma seminal con los diluyentes utilizados para la criopreservación de las muestras. Determinaron como algunos diluyentes, como la yema de huevo utilizada en este trabajo, afectaban a la interacción entre las proteínas del plasma seminal y las proteínas de la superficie espermática, necesarias para la capacitación, formación del reservorio y fecundación. Aunque ha aumentado el conocimiento sobre el proteoma del plasma seminal, se ignoran todas las posibles funciones de estas proteínas, pero su aplicación sería idónea para contribuir a la mejora de la calidad seminal.

En cuanto a la fragmentación nuclear de las muestras en el presente estudio, destacó la falta de correlación negativa entre el número de puentes disulfuro y los parámetros obtenidos del SCSA. Un incremento en el número de puentes disulfuro debería conllevar una reducción de la fragmentación nuclear (% DFI) y la descompactación (% HDS), pero este comportamiento no se observó en las correlaciones. Este hecho podría ser analizado en futuros estudios.

La aplicación de plasma seminal, especialmente 50 % PS causó reducciones de % DFI (porcentaje de espermatozoides con daños moderados o altos) de hasta un 10 %, pero no se debe asumir que estos espermatozoides o el resto están intactos. El daño detectado de fragmentación puede ser la “punta del iceberg” y puede haber presencia de otra serie de daños no detectables, como aneuploidías dadas durante la formación y maduración (Morales *et al.*, 2007). Es por ello que, pese a la reducción de la fragmentación con 50 % PS, los daños no detectables pueden impedir un correcto desarrollo.

6 Conclusiones

- La aplicación de 50 % de plasma seminal supone un gran incremento en el número de puentes disulfuro y, por tanto, un incremento en la compactación nuclear. Presentando resultados significativamente superiores ($P < 0.001$) a la aplicación de 10% de plasma seminal.
- A su vez, la aplicación de plasma seminal causa una serie de alteraciones que se traducen en grandes disminuciones en la viabilidad. Se cree que es debido a una gran elevación de los ROS intracelulares por la presencia de proteínas en el plasma seminal.
- El cómputo global con el resto de cambios de otros parámetros (modificaciones de la membrana, disminución de la fragmentación o la reversión de la criocapacitación) indican una mejora de la calidad de ciertas poblaciones de espermatozoides, mientras que los espermatozoides más sensibles sufren demasiados daños para ser viables.

7 Referencias

Amor, H. *et al.* (2019) ‘An additional marker for sperm DNA quality evaluation in spermatozoa of male partners of couples undergoing assisted reproduction technique (IVF/ICSI): Protamine ratio’, *Andrologia*, 51(10), p. e13400. doi: 10.1111/and.13400.

Alkmin, D. V. *et al.* (2014) ‘Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate’, *Cryobiology*, 69(2), pp. 203–210. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.004.

Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE) (2021) *ANICE - El Sector Cárnico*. Available at: https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico_171_1_ap.html (Accessed: 31 March 2021).

Bonet, M. O. and Mach, N. (2016) ‘Nutritional and non-nutritional factors may affect male infertility through epigenetic mechanisms’, *Nutricion Hospitalaria*, 33(5), pp. 1236–1244. doi: 10.20960/nh.591.

DG AGRI - Pigmear Production (2020). Available at: <https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardPigmear/PigmearProduction.html> (Accessed: 31 March 2021).

Didion, B. A. *et al.* (2009) ‘Boar fertility and sperm chromatin structure status: A retrospective report’, *Journal of Andrology*, 30(6), pp. 655–660. doi: 10.2164/jandrol.108.006254.

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. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.017.

Evenson, D. P., Larson, K. L. and Jost, L. K. (2002) ‘Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques’, *Journal of Andrology*. American Society of Andrology Inc., 23(1), pp. 25–43. doi: 10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x.

FAO (2018) ‘OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2018-2027’, *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Organisation for Economic Co-operation and Development – OECD*. doi: 10.1787/agr-outl-data-en.

Fernández-Gago, R. *et al.* (2017) ‘Thawing boar semen in the presence of seminal plasma improves motility, modifies subpopulation patterns and reduces chromatin alterations’, *Reproduction, Fertility and Development*, 29(8), pp. 1576–1584. doi: 10.1071/RD15530.

Fernández-Gago, R., Domínguez, J. C. and Martínez-Pastor, F. (2013) ‘Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study’, *Theriogenology*, 80(4), pp. 400–410. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.003.

García-Vázquez, F. A. *et al.* (2019) ‘Post-cervical artificial insemination in porcine: The technique that came to stay’, *Theriogenology*. Elsevier Inc., 129, pp. 37–45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.004.

García, J. C. *et al.* (2010) ‘Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility’, *Animal Reproduction Science*, 119(1–2), pp. 160–165. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.11.001.

Hernández, M. *et al.* (2007) ‘Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars’, *Journal of Andrology*, 28(5), pp. 689–697. doi: 10.2164/jandrol.107.002725.

Hezavehei, M. *et al.* (2018) ‘Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches’, *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), pp. 327–339. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012.

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

Kothari, S. *et al.* (2010) *Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function*, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, pp. 425–435.

Lacalle, E. *et al.* (2021) ‘Cold-shock test is a practical method for selecting boar ejaculates yielding appropriate seminal plasma for post-thawing supplementation’, *Animals*, 11(3), pp. 1–17. doi: 10.3390/ani11030871.

Monobromobimane (MBBr, NSC 608544, CAS Number: 71418-44-5) | Cayman Chemical (sin fecha). Available at: <https://www.caymanchem.com/product/17097/monobromobimane> (Accessed: 9 June 2021).

Morales, R. *et al.* (2007) *Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad Sperm DNA fragmentation and implications for fertility*. Alicante.

Oliva, R. (2006) ‘Protamines and male infertility’, *Human Reproduction Update*, 12(4), pp. 417–435. doi: 10.1093/humupd/dml009.

Pardede, B. P., Agil, M. and Supriatna, I. (2020) ‘Protamine and other proteins in sperm and seminal plasma as molecular markers of bull fertility’, *Veterinary World*. *Veterinary World*, 13(3) pp. 556–562. doi: 10.14202/vetworld.2020.556-562.

Parrilla, I. *et al.* (2020) ‘Boar seminal plasma: Current insights on its potential role for assisted reproductive technologies in swine’, *Animal Reproduction*, 17(3). doi: 10.1590/1984-3143-AR2020-0022.

Patankar, A. and Parte, P. (2017) ‘Sperm chromatin compaction and male infertility’, in *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*. Springer Singapore, pp. 295–315. doi: 10.1007/978-981-10-4017-7_17.

Peña, F. J. *et al.* (2003) ‘Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate’, *Animal Reproduction Science*, 78(1–2), pp. 85–98. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00049-6.

Pezo, F. *et al.* (2018) ‘Preservation of boar semen: An update’, *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), pp. 423–434. doi: 10.1111/rda.13389.

Ramírez-Vasquez, R. R. A. *et al.* (2019) ‘Cryopreservation and egg yolk extender components modify the interaction between seminal plasma proteins and the sperm surface’, *Theriogenology*, 140, pp. 153–163. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.025.

- Recuero, S. *et al.* (2019) 'Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa', *Theriogenology*, 137, pp. 36–42. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.035.
- Roca, J. *et al.* (2000) 'Will AI in pigs become more efficient?', *Theriogenology*, 1(86), pp. 187–193. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.026.
- Rodríguez-Almeida, F. A. *et al.* (2008) 'Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado', *Agrociencia*, 42(4), pp. 399–406. Available at: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400002 (Accessed: 12 June 2021).
- Seligman, J. *et al.* (1991) 'Sperm analysis by flow cytometry using the fluorescent thiol labeling agent monobromobimane', *Molecular Reproduction and Development*, 29(3), pp. 276–281. doi: 10.1002/mrd.1080290310.
- Shalgi, R., Seligman, J. and Kosower, N. S. (1989) 'Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: Analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane', *Biology of Reproduction*, 40(5), pp. 1037–1045. doi: 10.1095/biolreprod40.5.1037.
- ThermoFisher (2021) *Invitrogen™ - Reactive monobromobimane (mBBR), 25 mg.* Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M1378#/https://www.thermofisher.com:443> (Accessed: 9 June 2021).
- Toragall, M. M. *et al.* (2019) 'Evaluation of seminal fructose and citric acid levels in men with fertility problem', *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(3), pp. 199–203. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_155_18.
- Vadnais, M. L. *et al.* (2005) 'Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining', *Animal Reproduction Science*, 90(3–4), pp. 347–354. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.02.007.
- Vadnais, M. L. and Althouse, G. C. (2011) 'Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm', *Theriogenology*, 76(8), pp. 1508–1516. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.021.
- Waberski, D. *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.
- Yeste, M., Rodríguez-Gil, J. E. and Bonet, S. (2017) 'Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm', *Molecular Reproduction and Development*. John Wiley and Sons Inc., 84(9), pp. 802–813. doi: 10.1002/mrd.22840.
- Zhang, J. *et al.* (2018) 'Meat and nutritional quality comparison of purebred and crossbred pigs', *Animal Science Journal*, 89(1), pp. 202–210. doi: 10.1111/asj.12878.
- Zigo, M. *et al.* (2019) 'Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation', *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-49024-0.
- Zubkova, E. V., Wade, M. and Robaire, B. (2005) 'Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging', *Fertility and Sterility*, 84(SUPPL. 2), pp. 1191–1198. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.04.044.