



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

New Insights on Pig Seminal Cytokines

Nuevas Aportaciones sobre las Citoquinas
Seminales en Porcino

D^a. Lorena Concepción Padilla García

2020

PhD Thesis by publications

PhD Thesis by publications

Tesis Doctoral por compendio de publicaciones

1

Measurable cytokine concentrations in pig seminal plasma are modified by semen handling and storage. Padilla L, Barranco I, Parrilla I, Lucas X, Rodriguez-Martinez H, Roca J. *Biology* 2020, 9, 276; doi:10.3390/biology9090276.

2

Period of boar ejaculate collection contributes to the yearly intra-male variability of seminal plasma cytokines. Padilla L, Lucas X, Parrilla I, Perez-Patiño C, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Barranco I. *Biology* 2020, 9, 105; doi:10.3390/biology9050105.

3

Seminal plasma cytokines are predictive of the outcome of boar sperm preservation. Barranco I, Padilla L, Pérez-Patiño C, Vazquez JM, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J, Parrilla I. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 4;6:436; doi: 10.3389/fvets.2019.00436.

4

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is fully expressed in the genital tract, seminal plasma and spermatozoa of male pigs. Padilla, L, Martínez-Hernández, J, Barranco, I, Lucas, X, Pastor, L. M, Rodríguez-Martínez, H, Roca, J, Parrilla, I. *Scientific reports*, 2020, 10(1), 13360; doi: 10.1038/s41598-020-70302-9.

*Department of Animal Medicine and Surgery
Faculty of Veterinary Sciences
University of Murcia*

*My financial support was provided by the Spanish Ministry of economy industry
and competitiveness (MINECO, BES-2016-076404).*

All the studies performed in the present PhD Thesis were supported by:

MINECO (Spain) and FEDER funds (EU, AGL2015-69738-R),

Seneca Foundation Murcia (Spain, 19892/GERM/15),

FORMAS Stockholm (Sweden, 2017-00946 and 2019-00288),

Swedish Research Council (VR, 2015-05919),

and FORSS Stockholm (Sweden, 745971).

A mi familia

Acknowledgements

Agradecimientos

Esta Tesis refleja el trabajo realizado durante 4 años, imposible de alcanzar sin las personas que me han acompañado y a las que quiero agradecer su tiempo y ayuda.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi director de Tesis, el **Dr. Jordi Roca Aleu**. Me has ayudado incansablemente, me has enseñado a ser metódica y exigente en el trabajo. También en lo personal gracias, por tanto. Es un privilegio haberte tenido como director.

De la misma forma, quiero agradecer a mi directora de Tesis, la **Dra. Inmaculada Parrilla**. Gracias por enseñarme y motivarme. Tu paciencia infinita, tu ayuda y el cariño con el que me has transmitido la pasión por este trabajo hace que seas un referente para mí.

Al **Dr. Emilio Martínez**, por liderar este gran equipo y acogerme como una más. Un ejemplo de excelente profesional y mejor persona. Gracias por tus consejos. También agradecer al **Dr. Heriberto Rodríguez Martínez**. Estoy muy agradecida por su ayuda desinteresada, su amabilidad y disponibilidad. Ha sido un placer trabajar con usted. Al **Dr. Luis Miguel Pastor** por su experiencia y su disponibilidad. Gracias por ofrecerme su ayuda cuando la he necesitado.

A la **Dra. María Antonia Gil**, por tu apoyo, un ejemplo de gran investigadora. A la **Dra. Cristina Cuello**, gracias por tus consejos, eres un ejemplo para mí. A la **Dra. Xiomara Lucas**, trabajadora incansable. Gracias por tu amor, eres una persona muy especial para mí.

A las **Dras. Isabel Barranco y Cristina Pérez**. Cuando comencé la Tesis me cogisteis de la mano y no me habéis soltado consiguiendo que este camino haya sido más fácil. Sois para mí ejemplo de generosidad, amistad y profesionalidad. Sin vosotras no habría sido igual, os habéis convertido en parte de mi familia.

A las **Dras. Cristina Martínez y Alicia Nohalez**, compañeras y amigas y a la **Dra. Carolina Maside**, “mi madre no parida”, ha sido una suerte compartir estos años con vosotras. Gracias por todo.

A **Lola Ortega**, por estar siempre ahí cuando te he necesitado. A **Junwei Li** y a **Moisés** por vuestra ayuda. A **Miquel**, mi compañero. Desde que comenzamos juntos en el departamento has sido un gran apoyo. Al **Dr. Manuel Álvarez**, agradecer tu ayuda durante mi estancia en Linköping. Al **Dr. Jesús Martínez**, tu predisposición, tu ayuda y trabajo han sido fundamentales.

A la empresa **AIM Ibérica**, especialmente a la **Dra. María José Martínez** y **Manuel Molina** por vuestra predisposición y permitirme disponer de las muestras incluidas en esta Tesis. También agradecer al **Dr. Alfonso Bolarín, Paco** y en especial a **José Ramón** por su inestimable ayuda.

Al Departamento de **Anatomía y Anatomía Patológica Comparada**, especialmente al **Dr. Francisco José Pallarés**, por ofrecerme tu ayuda y el laboratorio siempre que lo he necesitado, y a los técnicos **Carlos, Juan y Pedro** gracias por vuestra predisposición.

Agradecer al **Ministerio de Economía, Industria y Competitividad**, por proporcionarme el soporte económico durante estos años.

A mi **hermana, familia y amigos**, sois el pilar fundamental de mi vida.

Quisiera agradecer a los animales que han formado parte de esta Tesis.

Contents

<u>Section</u>	<u>Page</u>
Introduction	1
Objectives	9
Extended summary	13
Conclusions	29
Abbreviations	33
Resumen general	37
References	61
Publications	67
Article 1	71
Article 2	75
Article 3	79
Article 4	83
Graphic appendix	87
Appendix	101

Introduction

Introduction

Seminal plasma (SP) is a mixture of secretions from testes, epididymides and mainly accessory sex glands (prostate, seminal vesicle and bulbourethral glands), with a complex composition, including metabolites, carbohydrates, lipids, hormones and, mostly, proteins (Rodríguez-Martínez et al., 2009). Accumulated evidence highlights that SP plays an essential role in many reproductive events, beyond nourishing, protecting or delivering sperm to female genital tract (Parrilla et al., 2020). Indeed, SP interacts both with spermatozoa during and after ejaculation, and with the internal female genital tract, once deposited in the artificial insemination (AI) or in the mating (Bromfield, 2018).

The most copious component of SP are proteins (Parrilla et al., 2020). Recently, the proteome of several mammalian species has been decoded, including that of pig SP, the species under study, where more than 850 proteins have been identified (Perez-Patiño et al., 2018). Focusing in the pigs, many of the SP proteins have been found to be directly or indirectly involved in key sperm functions such as motility, capacitation, preservability and even in sperm fertilizing ability (Roca et al., 2020). Consequently, some SP proteins are postulated as potential biomarkers of fertility for boars used in AI programs (Perez-Patiño et al., 2018). In addition, SP also contains a special family of proteins with important immunomodulatory functions which would interact with female reproductive tissues facilitating fertilization, development and embryo implantation, and placental development (Schjenken & Robertson, 2020). Among these molecules are the cytokines.

Cytokines are a plethora of proteins of low molecular weight (5-20 kDa) relevant in cell-to-cell communication and involved in many cell events (Dinarello, 2007; Parrilla et al., 2020). They are produced by a wide variety of cells and bind to membrane receptors on target cells defining their functionality (Dinarello, 2007). Cytokines are involved in biological processes such as growth, differentiation, maturation, and immune activation (Dinarello, 2007). Cytokines are recently acquiring growing reproductive interest because some of them would be directly

involved in the regulation of the immune environment of the female genital tract and, thereby, they would play a key role in development and embryo implantation (Schjenken & Robertson, 2020).

Seminal plasma contains measurable concentrations of a wide number of cytokines that would be synthesized in testes, epididymides and accessory sex glands (Fraczek & Kurpisz, 2015). Specifically, 16 cytokines have been measured in boar SP (Barranco et al., 2015) and many of them would clearly be involved in reproductive events. Some SP cytokines would be directly involved in key functions of sperm. Specifically, it has been shown in human semen that some SP cytokines are related to motility, viability, and sperm capacitation (Fraczek & Kurpisz, 2015; Laflamme, Akoum, & Leclerc, 2005). Unfortunately, there are few studies linking SP cytokines and sperm attributes in the livestock species (Rodríguez-Gil et al., 2007; Vera, Vásquez, & Muñoz, 2003). In addition, it has been proven in the human species that functional changes in the male reproductive organs lead to differences in the synthesis of cytokines and consequently in the measurable levels in SP (Fraczek & Kurpisz, 2015; Maegawa et al., 2002). Therefore, differences in some levels of SP cytokines are associated with some reproductive (dys)function (Syriou, Papanikolaou, Kozyraki, & Goulis, 2018). Other SP cytokines, as mentioned above, would be responsible for regulating the immune environment of the female genital tract once deposited during mating or insemination (Schjenken & Robertson, 2014). Thereby these SP cytokines would play a key role in the development and implantation of embryos and consequently in the female fertility success (Schjenken & Robertson, 2014). In sum, some SP cytokines have been postulated as biomarkers of nonspecific reproductive disorders and male infertility (Fraczek & Kurpisz, 2015).

Accurate quantification of circulating SP cytokine levels is essential for the practical use of such measurements in the clinical diagnosis of both male reproductive dysfunction and fertility. Unfortunately, there are currently no standardized protocols for the handling and storage of SP that guarantee reliable quantifications of seminal cytokines, in contrast to the existing well-defined guidelines for blood plasma. These guidelines propose to separate blood plasma as soon as possible and store it at -80°C for no more than two years

(Keustermans, Hoeks, Meerding, Prakken, & de Jager, 2013). Currently, no similar studies have been performed for semen samples in any species of mammal. Semen is a different body fluid from blood, both in cellular and plasma composition, and therefore valid guidelines for blood plasma may not be valid for SP. This Thesis includes a study aimed at evaluating how semen handling and SP storage influence SP cytokine measurements in pig, a major livestock species and a highly appreciated animal model for human medicine (Bassols et al., 2014). Moreover, SP cytokine levels vary between healthy males and among ejaculates within a male, as has recently been demonstrated in humans (Sharkey, Tremellen, Briggs, Dekker, & Robertson, 2017) and pigs (Barranco et al., 2015), which blurs the practical utility of SP cytokine levels as a diagnostic tool. The factors that explain this individual variability are still unknown (Sharkey et al., 2017). Recently, studies in humans indicated that annual fluctuations in environmental conditions could influence the circulating blood levels of cytokines in men (Ter Horst et al., 2016). In this context, the present Thesis includes a study testing the hypothesis that season of ejaculate collection influence the cytokine levels measured in pig SP samples. Being derived from wild boar, the domesticated pig is a species generally considered reproductively non-seasonal but still showing clear seasonal breeding/fertility, including clear differences in semen variables, even in breeding boars housed in buildings with a controlled environment (Roca et al., 2015; Suriyasomboon, Lundeheim, Kunavongkrit, & Einarsson, 2005).

Research in human semen has shown that SP levels of some cytokines have a positive or negative influence on sperm functionality in fresh semen samples (Maegawa et al., 2002). In this sense, it would be of scientific and practical utility to check whether seminal cytokines influence the ability of sperm to sustain preservation, either at liquid or frozen state. Semen, particularly in livestock species, is preserved for a variable time before usage in commercial AI programs. To our knowledge, only two studies have explored the influence of seminal cytokines on the ability of sperm to sustain preservation. Specifically, Rodríguez-Gil et al. (2007) highlighted the relevance of granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for the freezing of ovine sperm, while Mrkun et al. (2013) looked for the effects of tumor necrosis factor alpha (TNF α) on the quality

of sperm in pig semen short term stored at liquid state. These two pioneering studies, highlighting the putative involvement of only two specific SP cytokines in the preservation of sperm, encourage new studies to explore how relevant would be the involvement of the broad of SP cytokines for liquid and frozen preservation of spermatozoa. The opportunity for these studies is greater knowing that sperm storage capacity varies between males and that at present many of the factors that explain these individual differences are still unknown (Parrilla et al., 2020). Consequently, this Thesis includes a study aimed at evaluating whether the relative concentrations of several SP cytokines could have predictive value for the outcome of sperm preservation, either at liquid or frozen state, of ejaculates collected from boars used in AI programs.

Seminal plasma contains a wide variety of cytokines, as well indicated above. Some of these SP cytokines have focused a great scientific interest while others have aroused little interest. Among the first would be transforming growth factors beta (TGF- β) that has deserved substantial scientific interest because they contribute to regulate, at a molecular level, the reproductive phenomena occurred in the female reproductive tract after breeding, thus contributing to modulate the maternal immune response to embryo (Schjenken & Robertson, 2020). On the opposite side would be GM-CSF, a cytokine also present at relevant levels in porcine SP (Barranco et al., 2015). The GM-CSF is a pro-inflammatory cytokine with a molecular weight ranging from 50 to 15 kDa according to its glycosylation degree (Bhattacharya et al., 2015). This cytokine would be involved in immune regulatory functions as well as an on growth, proliferation, maturation, and function of hematopoietic cells (Bhattacharya et al., 2015). Currently, little information is available on the synthesis and function of GM-CSF in the male reproductive tract. In this regard, it is only known that it would be present in the male rat gonads and that it would play a role in spermatogenesis (Dirami, Ravindranath, Pursel, & Dym, 1999). Its proven presence at measurable levels in porcine SP, together with the little existing information, encourages further studies. Increasing knowledge about the role of GM-CSF cytokines in boar reproductive physiology could help improve our understanding of the spermatogenesis process and the functionality of mature sperm in boars, which could be relevant for the

study of some infertility or subfertility problems in the boar, but also for the optimization of the results of assisted reproduction techniques in pigs. With this scenario in mind, this Thesis includes a study focused on improving our current knowledge of GM-CSF present in the male reproductive tract.

Objectives

Objectives

The general objective of this PhD Thesis has been to **improve the current knowledge of seminal cytokines in pig, a species of great economic interest as a source of meat and also as an animal model for human medicine.**

For achieving the above general objective, the Thesis proposes four independent studies, each one focused on developing a specific objective as follow:

1

To evaluate the influence of semen handling and seminal plasma storage on seminal plasma cytokine measurements.

2

To analyze whether the year period of ejaculate collection, considered in terms of daylength and environment temperature, influences the seminal levels of cytokines.

3

To evaluate whether the relative concentrations of seminal cytokines could have predictive value for the outcome of sperm preservation, either at liquid or frozen state, in ejaculates of boars used in artificial insemination programs.

4

To identify and characterize the location and distribution of the granulocyte macrophage colony stimulating factor in the reproductive organs, epididymal fluid, seminal plasma and mature spermatozoa of boars.

Extended summary

Extended summary

Main objective

Boar SP contains measurable concentrations of many cytokines, which could be of analytical interest to predict and/or diagnose reproductive disorders, sperm (dys)functionality or even fertility outcomes (Barranco et al., 2015; Parrilla et al., 2020). Unfortunately, beyond their measurable concentrations, little else is known about pig seminal cytokines (Parrilla et al., 2020) and more studies are required. Accordingly, the main objective of the PhD Thesis was to improve the current knowledge of cytokines in the SP of pigs.

Ethical considerations

All procedures involving animals were performed according to European Union rules for animal welfare (Directive 2010-63-EU of the European Parliament and the Council of the European Union, 2010). The Bioethics Committee of the University of Murcia, with research code: 639/2012, approved the experiments carried out in this Thesis.

Biological material and general methods

Sample sources

Semen samples were provided by an AI center (AIM Iberica, Topigs Norsvin Spain SLU) located in Calasparra (Murcia) with the Spanish registration number (ES300130640127; August 2006) and the European registration number (ES13RS04P; July 2012) for production of seminal AI-doses. Samples of reproductive organs were collected in a commercial slaughterhouse (MercaMurcia SA, el Palmar, Spain) with Spanish registration number (ES300303320001; January 2000) and sanitary registration number 10.00213/MU.

Reagents and media

Unless stated otherwise, all media components and fluorochrome molecules used in the experiments were commercially available. The EDTA-free phosphate-buffered saline media (PBS) was used to dilute reagents, antibodies and fluorochrome molecules. The semen extender used for liquid semen was Beltsville thawing solution (BTS, Johnson, Aalbers, & Grooten, 1988) or a commercial extender (Biosem+, Magapor, Zaragoza, Spain) and the composition of freezing medium (FM) for sperm cryopreservation was 20% egg yolk (v/v) and 80% (v/v) Tris-citric acid-glucose extender (Alkmin et al., 2014).

Ejaculate donors and seminal plasma collection

The ejaculates used in the experiments were collected from healthy, fertile and mature boars of different breeds (Large White, Landrace, Pietrain and Duroc). The environmental conditions of this locality (38° 15'N, 1° 35'W) during the experiments were characterized by daylight varying from 9 h 30 min in the winter solstice to 14 h 50 min in the summer solstice and with maximum and minimum temperatures averaging 32.5°C in July (summer) and 3.6°C in January (winter), respectively. The building where boars were housed had controlled environmental conditions, both regarding temperature using air cooling, and light, through artificial lighting up to a total of 16 h of light per day. The boars were provided with water *ad libitum* and fed with commercial feedstuff specially formulated to fulfil the nutritional requirements of AI-boars.

Ejaculates were collected as one volume (whole ejaculate) or as ejaculate fractions using a semi-automatic procedure (Collectis®, IMV Technologies, L'Aigle, France) or the gloved-hand method, respectively. When fractionated, three fractions were collected, namely the first 10 mL of SRF (peak portion of sperm), the remaining SRF and the post-SRF. All ejaculates used in the experiments fulfilled the standards of quantity and sperm quality thresholds for liquid semen AI-doses. The SP was harvested by double centrifugation (1,500 xg, for 10 min at room temperature [RT]).

Sperm preservation

Sperm concentration and motility were initially assessed in the AI-centre using the routine analytical procedures. Then, semen samples were extended to 30×10^6 sperm/mL in Biosem+ extender, packed into semen bags and stored at 17°C. Semen samples to be cryopreserved were centrifuged (at 2,400 xg for 3 min at RT), and the sperm pellets were frozen using the 0.5-mL straw freezing procedure described by Alkmin et al. (2014). In brief, the sperm pellets were extended to a concentration of $1,500 \times 10^6$ sperm/mL in FM and cooled for 150 min at 5°C. The cooling samples were re-extended in FM supplemented with glycerol and Equex to a final concentration of $1,000 \times 10^6$ sperm/mL. The extended sperm samples were thereafter packed into 0.5-mL polyvinyl chloride French straws, frozen a commercial freezing unit with liquid nitrogen (LN₂) vapours (3 cm above LN₂ surface for 20 min) and stored in a LN₂ container. Frozen semen samples were thawed in a circulating water bath at 37°C for 20 s.

Assessment of sperm function

Spermatozoa were assessed for sperm motility (total and progressive, using a computer assisted sperm analyser). A minimum of 400 spermatozoa per sample were microscopically analysed from six different fields (UB200i, Proiser R+D SL). Data were recorded as percentage of total motile spermatozoa (average path velocity $\geq 20 \mu\text{m/s}$) and the proportion of motile spermatozoa with rapid and progressive movement (straight line velocity $\geq 40 \mu\text{m/s}$). The integrity of plasma and acrosomal membranes (sperm viability), intracellular H₂O₂ generation, sperm O₂⁻ production and lipid peroxidation (LPO) were evaluated using BD FACS Canto II cytometer and specific fluorophores. Specifically, sperm viability (plasma and acrosomal membranes integrity) was assessed using a triple staining including Hoechst 33342 (H-42) propidium iodide (PI, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and fluorescein-conjugated peanut agglutinin (PNA-FITC). Data were recorded as percentage of viable sperm with intact acrosome (H-42 positive, PI and PNA-FITC negative). The intracellular H₂O₂ generation was assessed in viable sperm using the fluorochromes 5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein

diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA, Invitrogen), PI and H-42, following a modified procedure described by Guthrie & Welch (2006). The percentage of viable spermatozoa (H-42 positive and PI negative) positive to CM-H₂DCFDA were recorded as sperm that generate H₂O₂. Total sperm O₂^{•-} production was assessed in viable sperm using the fluorochromes dihydroethidium (DHE, Invitrogen), H-42 and SYTOX Green (SYTOX, Invitrogen), following a modified procedure of Koppers et al. (2008). Data were reported as the percentage of viable spermatozoa (H-42 positive and SYTOX negative) positive to DHE. Lipid peroxidation was assessed in viable sperm using the fluorochromes C₁₁-Borondipyrromethene 581/591 (BODIPY, Invitrogen), H-42 and PI, following a modified procedure described by Koppers et al. (2008). The percentage of viable spermatozoa (H-42 positive and PI negative) positive to BODIPY were recorded.

Measurement of cytokine concentrations in seminal plasma

The concentration of cytokines in SP was quantified using the Luminex xMAP® technology, a multiplexed assay microsphere-based, following the protocols described by the manufacturers for 96-well multiscreen plates. Pre-coated magnetic beads (Cat#PCYTMG-23K-13PX for pig reactivity, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) were used for the determination of GM-CSF, interferon gamma (IFN γ), interleukin (IL) -1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α . The concentrations of TGF- β 1, - β 2 and - β 3 were measured using a 3-plex kit (Cat#TGFB-64K-03 for pig, human, mouse, rat, non-human primate, canine, feline reactivity, Merck Millipore). The plates were run on a MAGPIX® (Luminexcorp, Austin, TX, USA) with xPONENT software version 4.2 (Luminexcorp) for acquisition and MILLIPLEX® Analyst Version 5.1 (Merck Millipore) for data analysis. The median fluorescent intensity was analyzed using a 5-parameter logistic curve-fitting to calculate the concentrations of the cytokines in each sample. All cytokine concentrations were expressed as pg/mL.

Processing of reproductive tissue samples and of cauda epididymal contents

The boars used as SP donors were slaughtered (MercaMurcia slaughterhouse) still healthy and fertile following genetic progress reasons. Once slaughtered, sections of testis, epididymides (caput, corpus and cauda epididymis), prostate, seminal vesicle and bulbourethral glands were processed following standard protocols for immunohistochemistry (IHC) and western blotting (WB) analysis. The contents of the cauda epididymis (spermatozoa and fluid) were recovered by after retrograde infusion of air through the vas deferens. The sampled suspension was centrifuged at 800 xg for 8 min and the resulting sperm pellet processed for immunocytochemistry (ICC), as described below. The supernatant (epididymal fluid) was handled alike SP.

Sperm immunocytochemistry

Sperm samples of 30×10^6 cells/mL were incubated with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) to discern viable from non-viable spermatozoa. Thereafter they were fixed in 4% paraformaldehyde, extended in smears and incubated overnight with the primary antibody against GM-CSF (GM-CSF polyclonal rabbit orb6090, Biorbyt, St. Francisco, CA, USA). Thereafter, the smears were incubated with the secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, biotin-SP conjugate, Biorbyt) and then incubated with Streptavidin (Streptavidin, Alexa Fluor TM 555 conjugate, Thermo Fisher Scientific). Finally, the smears were mounted with Vectashield antifade mounting medium (Vector Laboratories, CA, USA) and 200 spermatozoa per sample were analyzed using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E800, Nikon Instruments Corporation, Melville, NY, USA).

Immunohistochemistry in reproductive tissues

Tissues sections of testis, ducti epididymides, prostate, seminal vesicle and bulbourethral glands (0.5 × 0.5 cm) were fixed in Bouin solution and then immersed in 70% alcohol and embedded in paraffin blocks. Four µm-thick sections of each tissue were dewaxed, rehydrated and treated with citrate buffer. Following blocking with methanol, the slides were incubated with the primary antibody against GM-CSF. Thereafter, sections were incubated with polyclonal goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with biotin (AP132B; Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, biotin-SP conjugate, Merck, Germany). The immunolabelling was performed with the avidin-biotin-complex method using Vectastain Elite ABC labelling kit and peroxidase-based staining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Labs, Burlingame, USA). Finally, Mayer's haematoxylin was used as nuclear counterstaining and the slides were mounted with VectaMount (Vector Labs). The immunostaining was microscopically (Olympus BX51, Olympus DP25 camera) evaluated at 400x, 600x and 1,000x magnification.

Western Blotting

Genital tract tissues, spermatozoa from ejaculate fractions and cauda epididymis, SP and epididymal fluid samples were all stored at -80°C and then thawed in ice for WB. The extraction of proteins was performed using a buffer PBS-SDS (Merck, Schuchardt, Germany) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini EDTA-free; Roche, Mannheim, Germany). Protein quantification was performed using the BCA protein Assay Kit (Thermo scientific, Rockford, USA) in the supernatant obtained after centrifugation. Then, protein suspension was denatured in loading buffer and loaded using Mini-PROTEAN TGX precast gels 4-15% Bis-Tris SDS-PAGE gel (Bio-Rad Laboratories, USA). Electrophoresis was performed with protein standards Precision Plus Protein Dual Colour Standards (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and then transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) by semidry electrophoretic transfer. Thereafter, the membranes were incubated with the primary rabbit polyclonal antibody against GM-CSF and then with the secondary antibody goat anti-rabbit

IgG biotinylated (Millipore, Temecula, California). Finally, the membranes were incubated with Horseradish peroxidase (HRP) Streptavidin (GE Healthcare, UK). Immunoreactive bands were located with Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, USA). The blotting images were performed using the ImageQuant LAS 500 (Healthcare Life Sciences). Densitometry was used with Image J software. Ponceau stain was used for total protein normalization.

Statistical analysis

Data were analysed using IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Spain, Madrid, Spain) and R software (www.r-project.org). The Shapiro-Wilk test was used to check the assumption of normality of data of sperm parameters and SP-cytokine concentrations. Data of SP cytokines measured in the Experiment 1 were analysed using non-parametric tests. Specifically, the Friedman test and Wilcoxon signed-rank test. Likewise, the concordance correlation coefficient was calculated to assess the agreement between the cytokine concentrations of baseline and experimental samples. In the Experiment 2, data were analysed using a two-way mixed effect intraclass correlation coefficient (IC) and ANOVA approaches. In Experiment 3, multiple linear regression models were performed for assessing the influence of SP-cytokines and storage times on sperm parameters. Before running regression analyses, the BayesVarSel package of R was used to test both the objective hypotheses and the selection of variables. In Experiment 4, a two-step hierarchical clustering analysis was performed to identify natural clusters within the fluorescent intensity expression of GM-CSF. The distribution of viable and non-viable sperm was evaluated using the Chi-square test. Differences in the relative content of GM-CSF in the WB bands were analysed using one-way ANOVA. Statistically significant differences were considered with a $p < 0.05$.

Experimental results

Experiment 1

The objective was to evaluate whether semen handling and SP storage influence the measurement of SP cytokines, in order to define the most suitable protocols to handle and store samples. Three separate trials were performed and the SP concentrations of 13 cytokines were measured in each one (GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF α).

The first trial evaluated the influence of three intervals between ejaculation and SP collection, namely 0 (control), 2 and 24 h. A total of 66 SP samples from 22 ejaculates were evaluated. The results showed that the concentrations of the 13 cytokines did not differ between 0 and 2 h. Regarding SP samples collected at 24 h after ejaculation, the concentrations of IL-1 β , IL-2, IL-6 and IL-18 were substantially higher ($p < 0.05$) than in those harvested at 0 h after ejaculation. Despite of this, the cytokine concentrations measured in the SP samples harvested at 2 and 24 h after ejaculate collection showed good or very good agreement with those measured at 0 h after ejaculation. Moreover, the cytokine concentrations measured in the SP samples harvested at 2 and 24 h showed good linearity ($p < 0.01$) with those measured at 0 h after ejaculation.

The second trial examined storage conditions for seminal plasma before analysis. Specifically, SP samples were stored in fresh (17°C; < 4 h; control) or at 5°C, -20°C and -80°C during 72 h. A total of 80 SP samples from 20 ejaculates were evaluated. Ten of the 13 cytokines measured were influenced ($p < 0.05$) by some of the three storage conditions, specifically GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 and TNF α . The agreement between the concentrations measured in the fresh and stored SP samples differed between both cytokines and storage conditions. Agreement was good or very good for IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-12; moderate for IL-4 and IL-10; poor for TNF α and bad for IFN γ , regardless of storage condition. The agreement for GM-CSF and IL-18 differed depending on storage conditions. The cytokine concentrations measured in fresh and stored SP samples showed good linearity.

The third trial evaluated the effect of frozen storage time on the SP cytokine content. A total of 60 SP samples from 20 ejaculates were evaluated. Cytokines were measured in fresh SP (17°C; < 4 h) and SP samples that remained stored at –20°C and –80°C for two months. Storage time affected ($p < 0.05$) the levels of nine of the 13 cytokines, irrespective of the freezing temperature (GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 and IL-18). The agreement between the concentrations measured in the fresh and stored SP samples differed between cytokines and also between storage temperatures. Agreement was good or very good for IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8; moderate for IL-1ra and IL-10; poor for GM-CSF and bad for IFN γ and TNF α , regardless of storage temperature. Agreement for IL-2, IL-4, IL-12 and IL-18 differed according to storage temperatures, being better between fresh and –80°C stored samples. Linearity between fresh and stored SP samples was poor or moderate for GM-CSF, IFN γ , IL-10, and TNF α , regardless of storage temperatures. The IL-2, IL-4, IL-12, and IL-18 concentrations of the SP samples stored at –20°C also showed poor or moderate linearity with those of the fresh SP samples.

In conclusion, seminal cytokines should be ideally measured in fresh SP specimens collected within 24 h after ejaculation. If storage of SP is imperative, store conditions should be adjusted for each cytokine of interest. The good linearity between fresh and stored SP samples suggests that any of the storage conditions tested here could be useful, provided that the chosen one was a consensus procedure and widely accepted by clinical laboratories.

This Experiment has been published in the journal **Biology** (2020, 9:276; doi:10.3390/biology9090276).

Experiment 2

This Experiment evaluated the relevance of intra-male variability in SP cytokines and to what extent the period of the year when an ejaculate is collected contributes to such variability. A total of 180 ejaculates were collected from nine boars over one year, at a rate of 20 ejaculates per boar with at least one ejaculate collected per boar and month. The SP-samples were grouped according to the two

daylength periods of the year characteristics of the northern hemisphere, namely increasing, from January to June, and decreasing, from July to December. A total of 90 SP-samples, 10 per boar, were analysed per each daylength period. The same 13 cytokines measured in the previous experiment were also analysed in these SP samples.

All measured cytokines showed differences between boars ($p < 0.001$). The intraclass correlation coefficient (IC) values were low for all measured cytokines (between -0.02 and 0.21), indicative of poor reliability and larger within-boar than between-boars variability. The daylength period of ejaculate collection influenced the SP concentration of all cytokines ($p < 0.001$) and there was interaction between boars and daylength periods ($p < 0.001$). Despite this, the pattern of variation in SP-cytokine concentrations between the daylength periods was similar, irrespective of boar. Higher ($p < 0.05$) SP-cytokine concentrations were seen during the increasing than during the decreasing daylength period. The SP-cytokines most influenced by daylength period were GM-CSF, IFN γ , IL-1ra and IL-6.

This Experiment confirmed the hypothesis tested demonstrating that the period of the year with different daylength (increasing/decreasing) significantly affected the concentration and intra-male total amount of SP-cytokines in mature healthy breeding boars. Thus, the period of the year of ejaculate collection would be one of the causes explaining intra-male variability in SP-cytokine levels, at least in breeding boars.

This Experiment has been published in the journal **Biology** (2020, 9:105; doi:10.3390/biology9050105).

Experiment 3

This Experiment evaluated the involvement of SP cytokines in the changes experienced by boar spermatozoa during their storage, either in liquid or frozen state.

Two separate trials were performed. In each trial, the semen samples were split in two aliquots, one to harvest SP whereas the other was liquid- or cryo-preserved. The first trial was performed with 28 semen samples of 1.2×10^9

spermatozoa that were extended in 40 mL of a commercial extender, alike semen AI-doses, and stored at liquid state (at 17°C) for 144 h. The second trial was performed with 27 frozen-thawed semen samples that were cryopreserved following a standard protocol for porcine semen (Alkmin et al., 2014). It included a freezing diluent with a final concentration of 3% glycerol and 0.5% Equex, packaging in 0.5-mL French straws, freezing at -40°C/min in a commercial freezing unit and thawing in a circulating water bath at 37°C for 20 s. In both trials, sperm attributes were assessed according to motility (total and progressive), integrity of plasma and acrosomal membranes (sperm viability) and the intracellular H₂O₂ generation, total O₂⁻ production and LPO in viable spermatozoa. The sperm attributes of the semen samples of the first trial were evaluated at 0, 72 or 144 h of liquid storage, whereas those of the second trial were evaluated before freezing and at 30- and 150-min post-thawing. In addition to the 13 cytokines measured in the two first Experiments, here were also measured the TGF-β1, -β2 and -β3 in the SP samples.

The results of the first trial showed that liquid storage influenced ($p < 0.01$) most of the sperm attributes evaluated. Specifically, total and progressive motility that declined between the 72 h and 144 h of storage, whereas the generation of both H₂O₂ and O₂⁻ and LPO that progressively increased along storage time. The predictive value of the seminal measurement of cytokines differed according to storage time at 17°C, being significant ($p < 0.05$) only by 144 h of storage. At this storage time, the SP cytokines showed good predictive value (adjusted R² equal or above 60%) for total and progressive motility, as they explained 68% and 60% of total variance, respectively. The predictive value of SP cytokines was lower (adjusted R² below 40%) for the other sperm parameters evaluated. Seven SP-cytokines were selected in the regression models for motility parameters, six of them common for total and progressive motility, specifically the anti-inflammatory TGF-β2, TGF-β3, IL-1ra and IL-4 and the pro-inflammatory IL-8 and IL-18. The results of the second experiment showed that both freeze-thaw and the post-thaw incubation time at 37°C affected ($p < 0.01$) all sperm attributes evaluated. Total and progressive motility and viable spermatozoa with intact acrosome decreased while H₂O₂ and O₂⁻ generation and LPO increased. The predictive value of SP

cytokines to post-thaw sperm attributes was additive to that of incubation time. The SP-cytokines showed good predictive value (adjusted R^2 above 60%) for all sperm parameters evaluated. The regression models for each sperm attribute included between four and five different SP-cytokines, being the anti-inflammatory IFN γ the only common in the models for all sperm attributes.

In summary, this Experiment demonstrated that many SP-cytokines would contribute to modulating the structural and metabolic changes exhibited by sperm during storage, albeit differentially regarding the preservation type.

This Experiment has been published in the journal **Frontiers in Veterinary Science** (2019, 6:436; doi: 10.3389/fvets.2019.00436).

Experiment 4

This last Experiment focused in GM-CSF; a pro-inflammatory cytokine poorly explored in the male reproductive tract. Accordingly, the aim was to improve the current knowledge of GM-CSF in reproduction, particularly its location and distribution alongside the male reproductive tract, SP and cauda epididymis and ejaculated spermatozoa, using IHC, ICC and WB procedures.

To carry out the experiment, tissues from reproductive tract, fluids (SP and epididymal fluid) and mature spermatozoa, from three healthy and fertile boars were used. Specifically, six ejaculates (two per boar) were fractionally collected (first 10 mL of SRF, remainder of SRF and post-SRF). Samples that mimicked entire ejaculate (EE) were generated by proportionally mixing samples of first 10 mL-SRF, rest of SRF and post-SRF. Thereafter, the reproductive organs of the three boars were collected once they were slaughtered in a commercial abattoir. The reproductive tissues (testes, epididymis and accessory sex glands) were analysed using IHC and WB approaches and the content of the cauda epididymis (mature sperm and fluid), SP and ejaculated spermatozoa were analysed using ICC and WB approaches.

The results showed positive labelling, indicative of the presence of GM-CSF, in all male reproductive tissues, fluids (epididymal and SP) and mature spermatozoa. In reproductive organs, WB revealed three forms of GM-CSF with

different degrees of glycosylation (15, 31 and 40 kDa). In SP and epididymal fluid, GM-CSF appeared only in its active form (15 kDa). Looking at SP of ejaculate fractions and EE, the first 10 mL of SRF had lower ($p < 0.05$) amounts of active GM-CSF than the rest of the SRF, post-SRF and EE. The mature spermatozoa, recovered from any source, e.g. from the first 10 mL of SRF, remainder of SRF, post-SRF, EE and cauda epididymis, showed the GM-CSF forms of 15 and 31 kDa but in a different proportion, depending on the sperm source. Interestingly, non-viable sperm showed more GM-CSF labelling than viable sperm.

In conclusion, this Experiment demonstrated that GM-CSF, both in poorly and highly glycosylated forms, is present in the reproductive tract of the male pig, and that it is further transported by the epididymal fluid, SP and mature spermatozoa.

This Experiment has been published in the journal **Scientific Reports (2020, 10:13360; doi.org/10.1038/s41598-020-70302-9)**

Conclusions

Conclusions

1

Storage of seminal plasma, whether chilled or frozen, influences cytokine measurements.

2

The seminal plasma concentrations of cytokines show intra-boar variability and the season of ejaculation collection would explain part of this variability.

3

The seminal plasma cytokines would contribute to modulating the structural and metabolic changes exhibited by sperm during preservation, either at liquid- or at frozen-state.

4

The pro-inflammatory GM-CSF cytokine is present, both in poorly and highly glycosylated forms, in the reproductive tract of the male pigs and it is transported by the epididymal fluid, seminal plasma and mature spermatozoa.

Abbreviations

Abbreviations

AI	Artificial insemination
BODIPY	C11-Borondipyrromethene 581/591
BTS	Beltsville thawing solution
CM-H2DCFDA	5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHE	Dihydroethidium
EE	Entire ejaculate
FM	Freezing medium
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
H-42	Hoechst 33342
HRP	Horseradish peroxidase
IC	Intraclass correlation coefficient
ICC	Immunocytochemistry
IFN γ	Interferon gamma
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
LN ₂	Liquid nitrogen
LPO	Lipid peroxidation
PBS	Phosphate-buffered saline media
PI	Propidium iodide
PNA-FITC	Fluorescein-conjugated peanut agglutinin
RT	Room temperature
SP	Seminal plasma
SRF	Sperm rich fraction
TGF- β	Transforming growth factors beta
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
WB	Western blotting

Resumen general

Resumen general

Introducción

El plasma seminal (PS) es una mezcla de secreciones procedentes del testículo, epidídimo y principalmente glándulas sexuales accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales), con una composición compleja, en la que se incluyen metabolitos, carbohidratos, lípidos, hormonas y, mayoritariamente, proteínas (Rodríguez- Martínez y cols., 2009). El PS desempeña un papel esencial en muchos eventos reproductivos, más allá de nutrir, proteger o transportar los espermatozoides al tracto genital femenino (Parrilla y cols., 2020). Así, el PS interactúa tanto con los espermatozoides, durante y después de la eyaculación, como con el tracto genital interno de la hembra, una vez es depositado en la inseminación artificial (IA) o en el apareamiento (Bromfield, 2018).

El componente más abundante del PS son las proteínas (Parrilla y cols., 2020). Recientemente, se ha decodificado el proteoma del PS de varias especies de mamíferos, incluido el de verraco, la especie en estudio, donde se han identificado más de 850 proteínas (Perez-Patiño y cols., 2018). Centrándonos en el cerdo, se ha demostrado que muchas de las proteínas del PS están implicadas directa o indirectamente en funciones clave de los espermatozoides, como la motilidad, capacitación, preservación e incluso la capacidad fecundante (Roca y cols., 2020). En consecuencia, algunas proteínas del PS se postulan como posibles biomarcadores de fertilidad para los verracos utilizados en programas de IA (Perez-Patiño y cols., 2018). Además, el PS contiene proteínas con importantes funciones inmunoregulatoras del tracto reproductivo femenino, facilitando la fertilización, el desarrollo e implantación embrionaria y el posterior desarrollo placentario (Schjenken & Robertson, 2020). Entre estas proteínas se encuentran las citoquinas.

Las citoquinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular (5-20 kDa) importantes en la comunicación intercelular e involucradas en muchos eventos celulares (Dinarello, 2007; Parrilla y cols., 2020). Son producidas por una amplia variedad de células y se unen a receptores de membrana de la célula receptora definiendo su funcionalidad (Dinarello, 2007). Las citoquinas están involucradas en procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación, la maduración y la respuesta inmune (Dinarello, 2007). Recientemente, las citoquinas están adquiriendo gran interés en reproducción ya que algunas de ellas estarían directamente involucradas en la regulación del entorno inmunológico del tracto genital femenino y, por lo tanto, desempeñarían un papel clave en el desarrollo y la implantación embrionaria (Schjenken & Robertson, 2020).

El PS contiene concentraciones medibles de una gran cantidad de citoquinas que se sintetizarían en el testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (Fraczek & Kurpisz, 2015). En concreto, se han medido hasta 16 citoquinas en el PS de porcino que podrían estar envueltas en eventos reproductivos (Barranco y cols., 2015). Ciertamente, algunas de las citoquinas del PS estarían directamente involucradas en funciones clave de los espermatozoides. Específicamente, se ha demostrado en el semen humano que algunas citoquinas seminales están relacionadas con la motilidad, la viabilidad y la capacitación espermática (Fraczek & Kurpisz, 2015; Laflamme, Akoum & Leclerc, 2005). Desafortunadamente, existen pocos estudios que relacionen las citoquinas del PS con parámetros espermáticos en las especies ganaderas (Rodríguez-Gil y cols., 2007; Vera, Vásquez & Muñoz, 2003). Por otro lado, se ha demostrado en la especie humana que algunos cambios funcionales en los órganos reproductores masculinos conllevan diferencias en la síntesis de citoquinas y, en consecuencia, en sus niveles medibles en el PS (Fraczek & Kurpisz, 2015; Maegawa y cols., 2002). Por lo tanto, las diferencias en algunos niveles de citoquinas seminales estarían asociadas con alguna (dis)función reproductiva (Syriou, Papanikolaou, Kozyraki & Goulis, 2018). Otras citoquinas seminales, como se mencionó anteriormente, serían las responsables de regular el entorno inmunológico del tracto genital femenino una vez depositado el semen durante el apareamiento o con la IA (Schjenken & Robertson, 2014). Por lo tanto, serían estas

citoquinas del PS las que desempeñarían un papel clave en el desarrollo e implantación del embrión y, en consecuencia, en la fertilidad en la hembra (Schjenken & Robertson, 2014). En consecuencia, se han postulado algunas citoquinas del PS como biomarcadores de trastornos reproductivos inespecíficos e infertilidad masculina (Fraczek & Kurpisz, 2015).

La cuantificación precisa de los niveles circulantes de citoquinas en el PS es determinante para que tales mediciones puedan tener utilidad práctica en el diagnóstico clínico, tanto de la disfunción reproductiva masculina como de la (in) fertilidad. Desafortunadamente, no existen protocolos estandarizados para el manejo y almacenamiento del PS que garanticen cuantificaciones precisas de las citoquinas seminales, lo que contrasta con las pautas existentes y bien definidas para el plasma sanguíneo. Así, para el plasma sanguíneo las directrices proponen separar el plasma lo antes posible y almacenarlo a -80°C durante no más de dos años (Keustermans, Hoeks, Meerding, Prakken & de Jager, 2013). Con respecto al PS, todavía no se han realizado estudios similares en ninguna especie de mamífero, incluida la humana. El semen es un fluido corporal diferente a la sangre, tanto en composición celular como plasmática y, por lo tanto, las pautas válidas para el plasma sanguíneo pueden no serlo para el PS. Esta Tesis incluye un estudio dirigido a evaluar cómo el manejo del semen y el almacenamiento de PS influyen en las mediciones de citoquinas seminales en porcino, una de las principales especies de interés ganaderas y un modelo animal muy valorado para la medicina humana (Bassols y cols., 2014). Además, los niveles de citoquinas del PS varían entre individuos sanos y entre los eyaculados de un mismo individuo, como se ha demostrado recientemente en humanos (Sharkey, Tremellen, Briggs, Dekker & Robertson, 2017) y también en cerdos (Barranco y cols., 2015), lo cual dificulta su utilidad práctica como herramienta de diagnóstico. Los factores que explican esta variabilidad individual aún se desconocen (Sharkey y cols., 2017). Recientemente, estudios en hombres indicaron que las fluctuaciones anuales en las condiciones ambientales podrían influir en los niveles circulantes de citoquinas sanguíneas (Ter Horst y cols., 2016). En este contexto, la presente Tesis incluye un estudio para evaluar la hipótesis que el periodo del año de recolección de los eyaculados influya en los niveles de citoquinas medidos en muestras de PS de porcino. El

cerdo doméstico se considera no estacional desde el punto de vista reproductivo, pero al derivar del jabalí, aún muestra una subyacente estacionalidad reproductiva, manifestándose en claras diferencias en los parámetros seminales, incluso en verracos alojados en centros de IA bajo condiciones ambientales controladas (Roca y cols., 2015; Suriyasomboon, Lundeheim, Kunavongkrit & Einarsson, 2005).

La investigación en semen humano ha demostrado que los niveles de algunas citoquinas del PS influyen positiva o negativamente sobre la funcionalidad espermática en muestras de semen fresco (Maegawa y cols., 2002). En este sentido, sería de utilidad científica y práctica comprobar si las citoquinas seminales influyen también en la capacidad de los espermatozoides para soportar la conservación, ya sea en estado líquido o congelado. El semen, particularmente en especies de ganado, se conserva durante un tiempo variable antes de su uso en programas comerciales de IA. Hasta donde sabemos, solo dos estudios han explorado la influencia de las citoquinas seminales en la capacidad de los espermatozoides para mantener la conservación. En concreto, Rodríguez-Gil y cols. (2007) destacaron la relevancia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en la criopreservación de espermatozoides de ovino, mientras que Mrkun y cols. (2013) analizaron los posibles efectos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) sobre la calidad del espermatozoide de cerdo almacenado a corto plazo en estado líquido. Estos dos estudios pioneros, que destacan la participación de dos citoquinas del PS en la conservación de los espermatozoides, alientan a futuras investigaciones para explorar si otras citoquinas del PS también influyen en la conservación de los espermatozoides, ya sea almacenados en estado líquido o congelados. La oportunidad para estos estudios es mayor sabiendo que la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides varía entre individuos y que los factores que explican estas diferencias individuales son poco conocidos (Parrilla et al., 2020). En consecuencia, esta Tesis incluye un estudio destinado a evaluar si las concentraciones relativas de 16 citoquinas del PS podrían tener valor predictivo de la capacidad de conservación de los espermatozoides de porcino, ya sea en estado líquido o congelado.

El PS contiene una amplia variedad de citoquinas, como ya se ha mencionado anteriormente. Algunas de estas citoquinas seminales han despertado un gran interés científico mientras que otras apenas han sido estudiadas. Los factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) han merecido un sustancial interés científico porque se ha demostrado que contribuyen a regular, a nivel molecular, los fenómenos reproductivos ocurridos en el tracto reproductor de la hembra tras la monta o la IA, contribuyendo así a modular la respuesta inmune materna hacia el embrión (Schjenken & Robertson, 2020). En el lado opuesto a las TGF- β s estaría el GM-CSF, una citoquina también presente en niveles relevantes en el PS de porcino (Barranco y cols., 2015). El GM-CSF es una citoquina pro-inflamatoria con un peso molecular que varía de 50 a 15 kDa según su nivel de glicosilación (Bhattacharya y cols., 2015). Esta citoquina estaría también involucrada en funciones de regulación inmune, así como en el crecimiento, proliferación, maduración y función de las células hematopoyéticas (Bhattacharya y cols., 2015). Actualmente hay poca información disponible sobre la síntesis y función de GM-CSF en el tracto reproductor masculino. En este sentido, solo se sabe que estaría presente en las gónadas de rata macho y que desempeñaría alguna función en la espermatogénesis (Dirami, Ravindranath, Pursel & Dym, 1999). Su demostrada presencia en los niveles apreciables en el PS de porcino, junto con la poca información existente, alienta a realizar estudios que profundicen en su conocimiento. Dicho conocimiento podría mejorar nuestra comprensión de la espermatogénesis y de la funcionalidad de los espermatozoides maduros. Conocimientos que podrían ser relevantes para explicar algunos problemas de infertilidad o subfertilidad masculina, pero también para optimizar las técnicas de reproducción asistida. Con este planteamiento, esta Tesis incluye un estudio enfocado a mejorar nuestro conocimiento actual sobre el GM-CSF presente en el aparato reproductor de porcino.

Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados, el objetivo principal de la Tesis Doctoral ha sido mejorar el conocimiento actual de las citoquinas seminales. Para lograr este objetivo, se plantearon y desarrollaron cuatro objetivos específicos:

1. Evaluar la influencia del manejo del semen y el almacenamiento del plasma seminal en las mediciones de las citoquinas seminales.
2. Evaluar si la época del año en la que se recogen los eyaculados influye en las concentraciones de citoquinas del plasma seminal en machos reproductores sanos.
3. Evaluar si las concentraciones de citoquinas seminales de eyaculados recogidos de verracos utilizados en programas de inseminación artificial tienen valor predictivo de la capacidad de almacenamiento de los espermatozoides, ya sea en estado líquido o congelado.
4. Evaluar la localización y distribución del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en tejidos del tracto reproductor, fluido epididimario, plasma seminal y espermatozoides maduros de verraco.

Material biológico y métodos generales

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las normas de la Unión Europea para el bienestar animal (Directiva 2010-63-UE del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, 2010). El Comité de Bioética de la Universidad de Murcia, con código de investigación: 639/2012, aprobó los experimentos realizados en esta Tesis. Las muestras de semen fueron proporcionadas por un centro privado de IA perteneciente a la Empresa AIM Ibérica (Topigs Norsvin Spain SLU) y ubicado en Calasparra (Murcia, 38° 15'N, 1° 35'W)). El centro está habilitado por el Estado español (ES300130640127; agosto de 2006) y la Unión Europea (ES13RS04P; julio de 2012) para la producción de dosis seminales de IA. Las condiciones ambientales de Calasparra durante el tiempo experimental se caracterizaron por una luz diurna que varió de 9 h 30 min en el solsticio de invierno a 14 h 50 min en el solsticio de verano y con temperaturas máximas y mínimas promedio de 32,5°C en julio (verano) y 3,6°C en enero (invierno), respectivamente. La nave donde se alojaban los verracos tenía condiciones ambientales controladas, tanto de temperatura, mediante el uso de refrigeración por aire, como de luz, mediante el uso de iluminación artificial hasta reunir un total de 16 h de luz por día. A los verracos se les suministró agua *ad libitum* y se les alimentó con piensos comerciales especialmente formulados para satisfacer los requisitos nutricionales de verracos de IA.

Las muestras de tejidos del tracto reproductivo se recogieron en un matadero comercial (MercaMurcia SA, el Palmar, España) con números de registro ES300303320001 y 10.00213/MU.

Reactivos y medios

A menos que se indique lo contrario, todos los componentes de los medios y los fluorocromos usados en los experimentos se adquirieron a Merck KgaA (Darmstadt, Alemania). El medio salino tamponado con fosfato sin EDTA (PBS) se utilizó para diluir reactivos, anticuerpos y fluorocromos. Los diluyentes Beltsville thawing solution (BTS, Johnson, Aalbers & Grooten, 1988) y Biosem + (Magapor, Zaragoza, España) se utilizaron para la dilución del semen en estado líquido. Para

la congelación espermática se utilizó medio de congelación (MC), un diluyente de glucosa-ácido tris-cítrico suplementado con un 20% de yema de huevo (v/v), 3% final de glicerol y 0,5% final de Orvus ExPaste (Alkmin y cols., 2014).

Verracos, eyaculados y recolección del plasma seminal

Los eyaculados utilizados en los experimentos se recogieron de verracos sanos, fértiles y sexualmente maduros de razas Large White, Landrace, Pietratin y Duroc. Los eyaculados se recogieron enteros o en fracciones separadas utilizando un procedimiento semiautomático (Collectis®, IMV Technologies, L'Aigle, Francia) o el método de la mano enguantada, respectivamente. Cuando la recogida fue fraccionada, se recogieron por separado tres fracciones, que fueron, los primeros 10 mL de la fracción rica (FR, porción con mayor cantidad de espermatozoides), la FR restante y la post-FR. Todos los eyaculados utilizados en los experimentos cumplieron con los estándares de cantidad y los umbrales de calidad del semen requeridos para la producción de dosis de IA conservadas en estado líquido. El PS se obtuvo mediante doble centrifugación (1.500 xg, durante 10 min a temperatura ambiente [TA]; Rotofix 32A; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania). Se comprobó microscópicamente que el PS estaba libre de células.

Preservación espermática

La concentración y la motilidad de los espermatozoides se evaluaron en el centro de IA utilizando los procedimientos analíticos de rutina. Posteriormente, las muestras de semen se extendieron a 30×10^6 espermatozoides/mL utilizando un diluyente comercial (Biosem +, Magapor, Zaragoza, España), se envasaron y se almacenaron a 17°C. Las muestras de semen para criopreservación se centrifugaron (a 2.400 xg durante 3 min a TA; Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Alemania) y los espermatozoides del pellet fueron criopreservados utilizando el protocolo descrito por Alkmin y cols. (2014). Brevemente, el pellet espermático se diluyó en MC hasta una concentración de 1.500×10^6 espermatozoides/mL y se enfrió lentamente durante 150 min a 5°C. Ya a 5°C, se rediluyó en MC suplementado con glicerol (3%, v/v final) y Equex (0,5%, v/v final) hasta una

concentración final de 1.000×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, los espermatozoides se envasaron en pajuelas de polivinilo de 0,5 mL. Las pajuelas se congelaron en una unidad de congelación comercial de vapores de nitrógeno líquido (N_2L , 3 cm por encima de la superficie de N_2L durante 20 min) y se almacenaron en un tanque de N_2L hasta su descongelación en un baño de agua circulante a $37^\circ C$ durante 20 s.

Evaluación de la calidad y funcionalidad del esperma

La calidad y funcionalidad espermática se evaluó en términos de motilidad espermática (total y progresiva), integridad de la membrana plasmática y acrosómica (viabilidad espermática), generación de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ intracelular y peroxidación lipídica (LPO). La motilidad total y progresiva se evaluó utilizando un sistema de análisis espermático computarizado (CASA, ISADV1, Proiser R + D SL, Paterna, España) y cámara de recuento Makler (Sefi Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel). El resto de los parámetros de calidad y funcionalidad espermática se analizaron por citometría de flujo (citómetro BD FACS Canto II, Becton Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, EEUU). La integridad de las membranas plasmáticas y acrosómicas (viabilidad espermática) se evaluó mediante una tinción triple que incluía yoduro de propidio (IP), Hoechst 33342 (H-42) y aglutinina de cacahuete conjugada con fluoresceína (PNA-FITC) considerando como espermatozoides viables y con acrosoma intacto los positivos a H-42 y negativos a IP y PNA-FITC. La generación de H_2O_2 intracelular se evaluó en espermatozoides viables utilizando los fluorocromos 5- (y-6) clorometil-20,70-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil éster (CM- H_2DCFDA , Invitrogen), IP y H-42, siguiendo un procedimiento modificado descrito por Guthrie & Welch (2006). Se consideró que generaban H_2O_2 los espermatozoides viables (H-42 positivos y IP negativos) positivos a CM- H_2DCFDA . La producción total de $O_2^{\cdot-}$ en espermatozoides viables se evaluó utilizando los fluorocromos dihidroetidio (DHE), H-42 y SYTOX Green (SYTOX), siguiendo una modificación del procedimiento de Koppers y cols. (2008). Se consideró que los espermatozoides viables (positivos a H-42 y negativos a SYTOX) y positivos a DHE generaban $O_2^{\cdot-}$

intracelular. La LPO se evaluó en espermatozoides viables utilizando los fluorocromos C₁₁-Borondipirrometeno 581/591 (BODIPY), H-42 y PI, siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Koppers y cols. (2008). Los espermatozoides viables (H-42 positivos y PI negativos) positivos a BODIPY se consideraron que experimentaban LPO.

Medición de las concentraciones de citoquinas en el plasma seminal

La concentración citoquinas seminales se cuantificó utilizando la tecnología Luminex xMAP®, un ensayo multiplexado basado en microesferas, siguiendo los protocolos descritos por el fabricante para placas de 96 pocillos. Se utilizaron perlas magnéticas pre-recubiertas (Cat # PCYTMG-23K-13PX con reactividad en cerdo, Merck Millipore, Burlington, MA, EEUU) para la determinación de las concentraciones seminales de las citoquinas GM-CSF, interferón gamma (IFN γ), interleuquina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 y TNF α . Las concentraciones de TGF- β 1, - β 2 y - β 3 se cuantificaron utilizando el kit Cat # TGFB-64K-03 con reactividad en cerdo, humano, ratón, rata, primate, canino y felino (Merck Millipore). Las placas se procesaron en un MAGPIX® (Luminexcorp, Austin, TX, EEUU) usando el software xPONENT versión 4.2 (Luminexcorp) para la adquisición y MILLIPLEX® Analyst Versión 5.1 (Merck Millipore) para el análisis de datos. Para calcular las concentraciones de las citoquinas se midió la intensidad media de fluorescencia utilizando la curva de la función logística de 5 parámetros. Todas las concentraciones se expresaron como pg/mL.

Procesamiento del contenido de la cola del epidídimo y del tejido reproductivo

Los verracos donantes de PS fueron sacrificados en un matadero comercial (MercaMurcia, Murcia) estando sanos y siendo aptos para donar semen de óptima calidad por motivos de reemplazo genético. Una vez sacrificados, se recogieron los testículos, los epidídimos y glándulas sexuales accesorias, que se procesaron siguiendo los protocolos estandarizados para el análisis de

inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB). El contenido de la cola del epidídimo (espermatozoides y fluido) se recuperó por aspiración desde el extremo proximal de la cola del epidídimo después de la infusión retrógrada de aire a través del conducto deferente. El contenido se centrifugó a 800 xg durante 8 min (Sorvall™ Legend Micro 21 R centrifuge, Thermo Scientific, Barcelona, España) y el sedimento de espermatozoides se procesó para inmunocitoquímica (ICQ) como se describe a continuación. El sobrenadante (fluido epididimario) se manipuló igual que el PS.

Inmunocitoquímica de espermatozoides

Muestras de espermatozoides a una concentración de 30×10^6 células/mL fueron incubadas con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para distinguir los espermatozoides viables de los no viables. A continuación, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se extendieron en frotis y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario contra GM-CSF (orb6090 GM-CSF de conejo policlonal, Biorbyt, San Francisco, CA, EEUU). Posteriormente, los frotis se incubaron con el anticuerpo secundario (cabra anti-IgG de conejo, conjugado con biotina, Biorbyt) y luego se incubaron con estreptavidina (Streptavidin, conjugada con Alexa Fluor™ 555, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, los frotis se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, CA, EEUU) y se analizaron 200 espermatozoides por muestra utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800, Nikon Instruments Corporation, Melville, Nueva York, EEUU).

Inmunohistoquímica en tejidos reproductivos

Se fijaron secciones de tejido de testículo, epidídimo, próstata, vesículas seminales y bulbouretrales (0,5 x 0,5 cm) en solución de Bouin, se sumergieron en alcohol al 70% y se embebieron en bloques de parafina. Se desparafinó una sección (4 μ m) de cada tejido, se rehidrató y se trató con tampón citrato. Las secciones en portaobjetos se bloquearon con metanol y se incubaron con anticuerpo primario frente GM-CSF. Posteriormente, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con

biotina (AP132B; anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, conjugado biotina-SP, Merck, Alemania). El inmunomarcaje se realizó con el método del complejo avidina-biotina usando el kit Vectastain Elite ABC y con tinción a base de peroxidasa con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector Labs, Burlingame, EEUU). Finalmente, se utilizó hematoxilina de Mayer para contrateñir y se montaron con cubreobjetos. La inmunotinción se evaluó microscópicamente (Olympus BX51, cámara Olympus DP25) a 400x, 600x y 1000x.

Western Blot

La extracción de proteínas se realizó utilizando un tampón PBS-SDS (Merck, Schuchardt, Alemania) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-free; Roche, Mannheim, Alemania). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, Rockfordd, EEUU). La suspensión de proteínas se desnaturalizó en tampón de carga y se cargó usando geles prefabricados Mini-PROTEAN TGX gel Bis-Tris SDS-PAGE al 4-15% (Bio-Rad Laboratories, EEUU). La electroforesis se realizó con estándares de proteínas Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, CA, EEUU) y se transfirió a una membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, EEUU) mediante transferencia electroforética semiseca. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo primario policlonal de conejo frente a GM-CSF y seguidamente con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (Millipore, Temecula, California). Finalmente, las membranas se incubaron con estreptavidina peroxidasa de rábano picante (HRP, GE Healthcare, Reino Unido). Las bandas inmunoreactivas se localizaron con Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, EEUU). Las imágenes de transferencia se realizaron utilizando ImageQuant LAS 500 (Healthcare Life Sciences) y para la densitometría se utilizó el software Image J. Se utilizó Ponceau para la normalización de proteínas totales.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el paquete IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM España, Madrid, España) y el software R (www.r-project.org). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la suposición de normalidad de los datos de los parámetros espermáticos y de las concentraciones de citoquinas. Los datos de las citoquinas en PS medidas en el Experimento 1 se analizaron utilizando pruebas no paramétricas. Específicamente, la prueba de Friedman y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Asimismo, se calculó el coeficiente de correlación de concordancia para evaluar la concordancia entre las concentraciones de citoquinas de las muestras basales y experimentales. En el Experimento 2, los datos se analizaron utilizando un coeficiente de correlación intraclase (CI) de efecto mixto bidireccional y la prueba ANOVA. En el Experimento 3, se realizaron múltiples modelos de regresión lineal para evaluar la influencia de las citoquinas del PS y de los tiempos de almacenamiento sobre los parámetros espermáticos. Antes de ejecutar los análisis de regresión, se utilizó el paquete BayesVarSel de R para probar tanto las hipótesis objetivas como la selección de variables. En el Experimento 4, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de dos pasos para identificar agrupaciones naturales dentro de la expresión de intensidad de fluorescencia de la citoquina GM-CSF. La distribución de espermatozoides viables y no viables se evaluó mediante la prueba de Chi-cuadrado. Las diferencias en el contenido relativo de GM-CSF en las bandas WB se analizaron usando la prueba ANOVA de una vía. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un $p < 0,05$.

Experimentos y resultados

La Tesis Doctoral incluye cuatro experimentos, cada uno de ellos relacionado con un objetivo específico.

Experimento 1

El objetivo fue evaluar cómo el manejo del semen y el almacenamiento del PS influyen en la cuantificación de las citoquinas seminales para, de este modo, definir los protocolos más adecuados de manejo y almacenamiento.

Se realizaron tres ensayos independientes y se cuantificaron las concentraciones de 13 citoquinas (GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 y TNF α) en cada uno de ellos.

El primer ensayo evaluó la influencia de tres intervalos de tiempo entre la eyaculación y la recolección del PS, en concreto 0 (control), 2 y 24 h. Se evaluaron un total de 66 muestras de PS procedentes de 22 eyaculados. Los resultados mostraron que las concentraciones de las 13 citoquinas no difirieron entre 0 y 2 h. Con respecto a las muestras de PS recogidas a las 24h después de la eyaculación, las concentraciones de IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-18 fueron más altas ($p < 0,05$) que en las muestras recogidas a las 0 h. A pesar de esto, las concentraciones de citoquinas en las muestras de PS recogidas a las 2 y 24 h mostraron una buena o muy buena concordancia con las concentraciones medidas a las 0 h. Además, las concentraciones de citoquinas de las muestras de las 2 y 24 h mostraron una buena linealidad ($p < 0,01$) con las medidas en las muestras 0 h.

El segundo ensayo examinó las condiciones de almacenamiento del PS antes de la cuantificación de citoquinas. Las muestras de PS se almacenaron en fresco (17°C; < 4 h; control) a 5°C, a -20°C y a -80°C durante 72 h. Se evaluaron un total de 80 muestras de PS procedentes de 20 eyaculados. Las concentraciones de 10 de las 13 citoquinas estuvieron influenciadas ($p < 0,05$) por alguna de las tres condiciones de almacenamiento, específicamente GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 y TNF α . La concordancia entre las concentraciones medidas en las muestras de PS frescas y almacenadas difirió entre las citoquinas y las condiciones de almacenamiento. La concordancia fue

buena o muy buena para IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 e IL-12; moderada para IL-4 e IL-10; pobre para TNF α y mala para IFN γ , independientemente de las condiciones de almacenamiento. La concordancia para GM-CSF e IL-18 difirió según las condiciones de almacenamiento. Las concentraciones de citoquinas medidas en muestras de PS almacenadas en fresco y almacenadas mostraron una buena linealidad.

El tercer ensayo evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento de las muestras de PS en congelación sobre las concentraciones seminales de las citoquinas. Se evaluaron un total de 60 muestras de PS procedentes de 20 eyaculados. Las citoquinas se midieron en muestras de PS frescas (17°C; <4 h, control) y almacenadas a -20°C y a -80°C durante dos meses. El tiempo de almacenamiento influyó ($p < 0,05$) en las concentraciones de nueve de las 13 citoquinas, independientemente de la temperatura de almacenamiento (GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-8, IL -12 e IL-18). La concordancia entre las concentraciones medidas en las muestras de PS frescas y almacenadas difirió entre las citoquinas y también entre las temperaturas de almacenamiento. La concordancia fue buena o muy buena para IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8; moderada para IL-1ra e IL-10; pobre para GM-CSF y mala para IFN γ y TNF α , independientemente de la temperatura de almacenamiento. La concordancia para IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18 difirió según la temperatura de almacenamiento, siendo mejor entre muestras frescas y almacenadas a -80°C. La linealidad entre las muestras de PS frescas y almacenadas fue pobre o moderada para GM-CSF, IFN γ , IL-10 y TNF α , independientemente de la temperatura de almacenamiento. Las concentraciones de IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18 de las muestras almacenadas a -20°C también mostraron una linealidad pobre o moderada con las de las muestras frescas.

En conclusión, las concentraciones de las citoquinas seminales se deberían cuantificar en muestras de PS frescas recogidas dentro de las 24 h posteriores a la eyaculación. Si el almacenamiento del PS es necesario, las condiciones de almacenamiento deberían ajustarse para cada citoquina. La buena linealidad entre las cuantificaciones de las citoquinas de las muestras de PS frescas y almacenadas sugiere que cualquiera de las condiciones de almacenamiento aquí

probadas podría ser útil, siempre que la elegida fuera de consenso y ampliamente aceptada por los laboratorios clínicos.

Este Experimento ha sido publicado en la revista **Biology** (2020, 9: 276; doi: 10.3390 / biology9090276).

Experimento 2

Este Experimento evaluó la relevancia de la variabilidad intra-verraco en las concentraciones de citoquinas seminales y en qué medida el período del año de recogida de los eyaculados contribuye a dicha variabilidad.

Se recogieron un total de 180 eyaculados de nueve verracos a lo largo de un año, a razón de 20 eyaculados por verraco, con al menos un eyaculado recogido por verraco y mes. Las muestras de PS se agruparon de acuerdo con los dos períodos del año definidos por la duración del día característicos del hemisferio norte. Es decir, período creciente, de enero a junio, y periodo decreciente, de julio a diciembre. Se analizaron un total de 90 muestras de PS, 10 por verraco, por cada período de duración del día. Se cuantificaron las mismas 13 citoquinas cuantificadas en el experimento anterior.

Los resultados mostraron diferencias entre los verracos ($p < 0,001$) en las 13 citoquinas cuantificadas. Los valores de CI fueron bajos para todas las citoquinas cuantificadas (entre $-0,02$ y $0,21$), lo que indica una confiabilidad deficiente y una mayor variabilidad intra-verraco que entre verracos. El período de recogida de los eyaculados influyó en las concentraciones de las 13 citoquinas ($p < 0,001$) y hubo interacción entre verracos y período ($p < 0,001$). A pesar de esto, el patrón de variación en las concentraciones de las citoquinas entre los períodos de duración del día fue similar, independientemente del verraco. Este patrón se caracterizó por concentraciones más altas ($p < 0,05$) en el período creciente que en el decreciente. Las citoquinas seminales más influenciadas por el período de luz fueron GM-CSF, IFN γ , IL-1ra e IL-6.

Este Experimento confirmó la hipótesis propuesta al demostrar que el período del año con diferente duración del día (creciente/decreciente) de recogida de los eyaculados influye en la concentración de las citoquinas seminales. Por lo

tanto, el período del año de recogida de los eyaculados sería una de las causas que explican la variabilidad intra-individuo en las concentraciones seminales de citoquinas, al menos en verracos utilizados en programas de IA.

Este Experimento ha sido publicado en la revista **Biology** (2020, 9: 105; doi: 10.3390 / biology9050105).

Experimento 3

Este Experimento evaluó la implicación de las citoquinas del PS en los cambios funcionales que experimentan los espermatozoides de cerdo durante el almacenamiento, ya sea en estado líquido o congelado.

Se realizaron dos ensayos independientes. En cada ensayo las muestras de semen se dividieron en dos alícuotas, un para obtener el PS mientras que la segunda se almacenó como se describe más adelante. En el primer ensayo, centrado en muestras conservadas en estado líquido, un total 28 muestras de semen se diluyeron en un diluyente comercial hasta un volumen de 40 mL y a una concentración de $1,2 \times 10^9$ espermatozoides/mL, semejando a las dosis de semen para IA, y se almacenaron a 17°C durante 144 h. En el segundo ensayo, centrado en muestras conservadas en congelación, se criopreservaron 27 muestras de semen siguiendo un protocolo estandarizado para semen porcino (Alkmin y cols., 2014) ya descrito anteriormente. La calidad y funcionalidad espermática se evaluó a las 0, 72 o 144 h de almacenamiento líquido (ensayo 1) y a los 30 y 150 min después de la descongelación (ensayo 2). Además de las 13 citoquinas cuantificadas en los dos experimentos anteriores, en este experimento también se cuantificaron la TGF- β 1, - β 2 y - β 3.

Los resultados del primer ensayo mostraron que el almacenamiento de semen en estado líquido influyó ($p < 0,01$) en la mayoría de los parámetros de calidad y funcionalidad espermática. En concreto, la motilidad total y progresiva descendió entre las 72 y las 144 h de almacenamiento, mientras que la generación tanto de H_2O_2 como de $O_2^{\cdot -}$ y la LPO aumentó progresivamente a lo largo del tiempo de almacenamiento. El valor predictivo de las citoquinas seminales difirió según el tiempo de almacenamiento, siendo significativo ($p < 0,05$) solo para las

144 h de almacenamiento. A este tiempo de almacenamiento, las citoquinas del PS mostraron un buen valor predictivo (R^2 ajustado igual o superior al 60%) para la motilidad total y progresiva, ya que explicaron el 68% y el 60% de la varianza total, respectivamente. El valor predictivo de las citoquinas del PS fue menor (R^2 ajustado por debajo del 40%) para los otros parámetros espermáticos evaluados. Los modelos de regresión seleccionaron siete citoquinas teniendo en cuenta los parámetros de motilidad, seis de ellas fueron comunes para la motilidad total y progresiva, fueron las citoquinas anti-inflamatorias TGF- β 2, TGF- β 3, IL-1ra e IL-4 y las pro-inflamatorias IL-8 e IL-18. Los resultados del segundo experimento mostraron que tanto la criopreservación como el tiempo de incubación a 37°C posterior a la descongelación influyeron ($p < 0,01$) en todos los parámetros de funcionalidad espermática evaluados. La motilidad total y progresiva y el porcentaje de espermatozoides viables disminuyeron mientras que la generación de H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ y la LPO aumentaron. El valor predictivo de las citoquinas seminales para los parámetros espermáticos después de la descongelación fue adicional al del tiempo de incubación. Las citoquinas del PS mostraron un buen valor predictivo (R^2 ajustado por encima del 60%) para todos los parámetros espermáticos evaluados. Los modelos de regresión para cada parámetro espermático incluyeron entre cuatro y cinco citoquinas diferentes, siendo la anti-inflamatoria IFN γ la única citoquina común en los modelos para todos los parámetros espermáticos.

En resumen, este Experimento demostró que muchas de las citoquinas del PS contribuirían a modular los cambios funcionales exhibidos por los espermatozoides durante el almacenamiento, siendo diferentes las citoquinas que influyen en el semen almacenado en estado líquido de las que lo hacen en el semen congelado-descongelado.

Este Experimento ha sido publicado en la revista **Frontiers in Veterinary Science** (2019, 6: 436; doi: 10.3389 / fvets.2019.00436).

Experimento 4

Este último Experimento se centró en la citoquina GM-CSF; una citoquina pro-inflamatoria poco explorada en el tracto reproductivo masculino. En consecuencia, el objetivo fue mejorar el conocimiento actual de la GM-CSF, en particular su ubicación y distribución a lo largo del tracto reproductivo masculino, en el PS, en la cola del epidídimo (espermatozoides y fluido) y en los espermatozoides eyaculados, utilizando para ello procedimientos de IHQ, ICQ y WB.

Para la realización del experimento se utilizaron tejidos y fluidos del tracto reproductivo y espermatozoides maduros de tres verracos sanos y fértiles. Se recolectaron fraccionadamente seis eyaculados (dos por verraco, los primeros 10 mL de la FR, resto de FR y post-FR) y muestras proporcionales de las tres fracciones se mezclaron para generar muestra del eyaculado completo (EC). Una vez sacrificados, se recolectaron los órganos reproductores de los tres verracos y tejidos de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias se analizaron mediante IHQ y WB. El contenido de la cola del epidídimo (espermatozoides maduros y líquido epididimario), el PS y los espermatozoides eyaculados se analizaron mediante ICQ y WB.

Los resultados mostraron un marcaje positivo, indicativo de la presencia de GM-CSF, en todos los tejidos, fluidos y en los espermatozoides maduros. En los tejidos, el WB reveló tres formas moleculares de GM-CSF con diferentes grados de glicosilación (15, 31 y 40 kDa). En el PS y en el líquido epididimario, la GM-CSF apareció solo en su forma activa (15 kDa). En cuanto al PS de las fracciones del eyaculado y del EC, los primeros 10 mL de la FR tenían cantidades más bajas ($p < 0,05$) de GM-CSF activo que el resto de la FR, post-FR y EC. Los espermatozoides maduros recuperados de todas las fuentes, es decir, de los primeros 10 mL de la FR, resto de FR, post-FR, EC y cola del epidídimo, mostraron las formas de GM-CSF de 15 y 31 kDa, pero en una proporción diferente según la fuente de espermatozoides. Curiosamente, los espermatozoides no viables mostraron más marcaje de GM-CSF que los espermatozoides viables.

En conclusión, este Experimento demostró que la citoquina GM-CSF, tanto en forma poco glicosilada como en formas glicosiladas, está presente en los tejidos del tracto reproductivo del verraco, y que, una vez secretada, es transportada por el fluido epididimario, PS y espermatozoides maduros.

Este Experimento ha sido publicado en la revista **Scientific Reports** (2020, 10: 13360; doi.org/10.1038/s41598-020-70302-9).

Conclusiones

1. El almacenamiento del plasma seminal, ya sea en refrigeración o en congelación, influye en la cuantificación de las citoquinas seminales.
2. Las concentraciones seminales de citoquinas muestran una clara variabilidad intra-verraco y el período del año (luz creciente/decreciente) de recogida de los eyaculados explicaría parte de dicha variabilidad.
3. Las citoquinas del plasma seminal contribuirían a modular los cambios funcionales que experimentan los espermatozoides durante el almacenamiento, ya sea en estado líquido o criopreservado.
4. La citoquina pro-inflamatoria GM-CSF está presente, tanto en su forma poco glicosilada como en las altamente glicosiladas, en los tejidos del tracto reproductivo del verraco y, una vez secretada, es transportada por el fluido epididimario, plasma seminal y los espermatozoides maduros.

Abreviaturas

BODIPY	C ₁₁ -Borondipirrometeno 581/591
BTS	Beltsville thawing solution
CI	Coeficiente de correlación intraclase
CM-H ₂ DCFDA	5- (y-6) clorometil-20,70-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil éster
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidio
EC	Eyaculado completo
MC	Medio de congelación
FR	Fracción rica
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H-42	Hoechst 33342
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IA	Inseminación artificial
ICQ	Inmunocitoquímica
IFN γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IP	Ioduro de propidio
LPO	Peroxidación lipídica
N ₂ L	Nitrógeno líquido
PBS	Medio salino tamponado con fosfato
PNA-FITC	Aglutinina de cacahuete conjugada con fluoresceína
PS	Plasma seminal
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Factores de crecimiento transformante beta
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
WB	Western blot

References

References

- Alkmin, D. V., Perez-Patiño, C., Barranco, I., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., ... Roca, J. (2014). Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*, *69*(2), 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.004>
- Barranco, I., Rubér, M., Perez-Patiño, C., Atikuzzaman, M., Martinez, E. A., Roca, J., & Rodriguez-Martinez, H. (2015). The seminal plasma of the boar is rich in cytokines, with significant individual and intra-ejaculate variation. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N. Y. : 1989)*, *74*(6), 523–532. <https://doi.org/10.1111/aji.12432>
- Bassols, A., Costa, C., Eckersall, P. D., Osada, J., Sabrià, J., & Tibau, J. (2014). The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics. Clinical Applications*, *8*(9–10), 715–731. <https://doi.org/10.1002/prca.201300099>
- Bhattacharya, P., Budnick, I., Singh, M., Thirupathi, M., Alharshawi, K., Elshabrawy, H., ... Prabhakar, B. S. (2015). Dual role of GM-CSF as a pro-inflammatory and a regulatory cytokine: implications for immune therapy. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *35*(8), 585–599. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0149>
- Bromfield, J. J. (2018). Review: The potential of seminal fluid mediated paternal-maternal communication to optimise pregnancy success. *Animal*, *12*(s1), s104–s109. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000083>
- Dinarello, C. A. (2007). Historical Review of Cytokines. *European Journal of Immunology*, *37*(Suppl 1), S34–S45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772.Historical>
- Dirami, G., Ravindranath, N., Pursel, V., & Dym, M. (1999). Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type a spermatogonia cultured in KSOM1. *Biology of Reproduction*, *61*(1), 225–230. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.225>

- Fraczek, M., & Kurpisz, M. (2015). Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *Journal of Reproductive Immunology*, *108*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001>
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, *84*(8), 2089–2100. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-766>
- Johnson, L. A., Aalbers, J. G., & Grooten, H. G. (1988). Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Reproduction in Domestic Animals*, *23*(2), 49–55. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1988.tb01080.x>
- Keustermans, G. C. E., Hoeks, S. B. E., Meerding, J. M., Prakken, B. J., & de Jager, W. (2013). Cytokine assays: An assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods*, *61*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.04.005>
- Koppers, A. J., De luliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *93*(8), 3199–3207. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2616>
- Laflamme, J., Akoum, A., & Leclerc, P. (2005). Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. *Molecular Human Reproduction*, *11*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah142>
- Maegawa, M., Kamada, M., Irahara, M., Yamamoto, S., Yoshikawa, S., Kasai, Y., ... Aono, T. (2002). A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology*, *54*(1–2), 33–42. [https://doi.org/10.1016/s0165-0378\(01\)00063-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0378(01)00063-8)
- Mrkun, J., Kosec, M., & Zrimšek, P. (2013). Value of semen parameters, with special reference to TNF- α , in predicting the quality of boar semen after short-term storage. *Acta Veterinaria Hungarica*, *61*(2), 209–219. <https://doi.org/10.1556/AVet.2013.009>

- Parrilla, I., Martínez, E. A., Gil, M. A., Cuello, C., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., & Martínez, C. A. (2020). Boar seminal plasma: current insights on its potential role for assisted reproductive technologies in swine, *17*(891663), 1–20.
- Perez-Patiño, C., Parrilla, I., Barranco, I., Vergara-Barberán, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., ... Roca, J. (2018). New in-depth analytical approach of the porcine seminal plasma proteome reveals potential fertility biomarkers. *Journal of Proteome Research*, *17*(3), 1065–1076. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00728>
- Roca, J., Broekhuijse, M. L. W. J., Parrilla, I., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E. A., & Bolarin, A. (2015). Boar Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized? *Reproduction in Domestic Animals*, *50*, 48–55. <https://doi.org/10.1111/rda.12530>
- Roca, J., Perez-Patiño, C., Barranco, I., Padilla, L. C., Martínez, E. A., Rodríguez-Martínez, H., & Parrilla, I. (2020). Proteomics in fresh and preserved pig semen: Recent achievements and future challenges. *Theriogenology*, *150*, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.066>
- Rodríguez-Gil, J. E., Silvers, G., Flores, E., Jesús Palomo, M., Ramírez, A., Montserrat Rivera, M., ... Concha, I. I. (2007). Expression of the GM-CSF receptor in ovine spermatozoa: GM-CSF effect on sperm viability and motility of sperm subpopulations after the freezing-thawing process. *Theriogenology*, *67*(8), 1359–1370. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.008>
- Rodríguez-Martínez, Kvist, U., Saravia, F., Wallgren, M., Johannisson, A., Sanz, L., ... Calvete, J. J. (2009). The physiological roles of the boar ejaculate. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, *66*, 1–21. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19848263>
- Schjenken, J. E., & Robertson, S. A. (2014). Seminal fluid and immune adaptation for pregnancy - comparative biology in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, *49*, 27–36. <https://doi.org/10.1111/rda.12383>
- Schjenken, J. E., & Robertson, S. A. (2020). The female response to seminal fluid. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2018>
- Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Briggs, N. E., Dekker, G. A., & Robertson, S. A. (2017). Seminal plasma pro-inflammatory cytokines interferon- γ (IFNG) and C-X-C

- motif chemokine ligand 8 (CXCL8) fluctuate over time within men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *32*(7), 1373–1381. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex106>
- Suriyasomboon, A., Lundeheim, N., Kunavongkrit, A., & Einarsson, S. (2005). Effect of temperature and humidity on sperm morphology in duroc boars under different housing systems in Thailand. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *67*(8), 777–785. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.777>
- Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., & Goulis, D. G. (2018). Cytokines and male infertility. *European Cytokine Network*, *29*(3), 73–82. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0412>
- Ter Horst, R., Jaeger, M., Smeekens, S. P., Oosting, M., Swertz, M. A., Li, Y., ... Netea, M. G. (2016). Host and environmental factors influencing individual human cytokine responses. *Cell*, *167*(4), 1111-1124.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.018>
- Vera, O., Vásquez, L. A., & Muñoz, M. G. (2003). Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology*, *60*(3), 553–558. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00031-1)

Publications

Publications

1

biology

Measurable Cytokine Concentrations in Pig Seminal Plasma Are Modified by Semen Handling and Storage

Lorena Padilla^{1,2}, Isabel Martínez^{1,2,3}, Susana Peña^{1,2,3}, Cristina Ferrás^{1,2,3}, Ximena López^{1,2}, Herberto Rodríguez-Martínez^{1,2} and José Rosa^{1,2,3*}

Abstract Semen handling and storage are critical steps for the reliable measurement of circulating biomarkers in biological fluids. This study evaluates how cytokine measurements in pig seminal plasma (SP) vary depending on semen handling and SP storage. Thirteen cytokines (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18 and TNF- α) were measured using Luminex[®] technology in individual seminal plasma (SP) samples ($n = 62$) from healthy breeding boars. These separate experiments evaluated the effect of (1) and (2) on SP collection after ejaculation (Experiment 1) and SP storage, either short-term (1°C, -20°C and -80°C for 72h, Experiment 2) or long-term (at -20°C and -80°C for two months, Experiment 3), before analysis. Levels in fresh SP samples were used as baseline control values. Changes in SP handling of up to 24 h did not substantially impact SP cytokine measurements. Some cytokines showed instability in stored SP samples, mainly in long-term storage. Ideally, cytokines in pig SP should be measured in fresh samples harvested within 24 h after ejaculation. If storage of SP is imperative, storage conditions should be adjusted for each cytokine.

Keywords: seminal plasma, storage, cytokines, pig

1. Introduction

Seminal plasma (SP) is a complex fluid, with biomarkers playing key roles in sperm function, fertilization and zygote development and implantation [1]. Indeed, SP components are directly involved in essential functions of the spermatozoa, such as motility and capacitation [1]. In addition, SP components are also involved in the regulation of the uterine immune environment facilitating the development and implantation of embryos [2]. Consequently, SP components are routinely being explored for potential biomarkers of male fertility [3]. Among these biomarkers are cytokines, low-molecular-weight signaling proteins/peptides involved in intercellular communication, tissue homeostasis and the body's immune response [4–6]. Male reproductive organs, including the testis, epididymus and accessory sex glands, synthesize cytokines with variable amount released into the SP [1]. Functional changes in the male reproductive organs lead to differences in cytokine synthesis, therefore, differences in SP cytokine levels are observed in reproductive dysfunction [1,7].

2. Introduction

Seminal plasma (SP), a complex fluid mainly secreted from the epididymus and the accessory sex glands, contains many bioactive components, particularly proteins and peptides [1–3]. These SP proteins and peptides play a key role in regulating both sperm function (i.e., fertilizing ability, and in the uterine immune environment once deposited into the female genital tract [4–6]). Consequently, the SP proteins are routinely being explored for potential biomarkers of male fertility [7–9].

The SP proteins include cytokines, small proteins that have acquired gene by reproductive interest in recent years because some of them are directly involved in the regulation of the immune environment of the female genital tract and, thereby, they play a key role in development and embryo-implantation [10,11]. Moreover, some SP cytokines are also involved in sperm function [11,12].

2

biology

Period of Boar Ejaculate Collection Contributes to the Yearly Intra-Male Variability of Seminal Plasma Cytokines

Lorena Padilla^{1,2}, Ximena López^{1,2,3}, Susana Peña^{1,2,3}, Cristina Ferrás^{1,2,3}, Ximena López^{1,2}, Herberto Rodríguez-Martínez^{1,2} and José Rosa^{1,2,3*}

Abstract The concentrations of cytokines in seminal plasma (SP) fluctuate over time in healthy males, weakening their practical usefulness as diagnostic tools. This study evaluated the relevance of intra-male variability in SP cytokines and to what extent the period of the year when ejaculate is collected contributes to such variability. Thirteen cytokines (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18 and TNF- α) were measured using the Luminex[®] technology for 180 SP samples of ejaculate collected over a year from one healthy and fertile boar. The SP samples were grouped into two annual periods according to decreasing or increasing day length and ambient temperature. Intra-male variability was higher than inter-male variability for all cytokines. All SP cytokines showed concentration differences between the two periods of the year, showing the highest concentrations during the increasing day length/temperature period, irrespective of the male. Similarly, some cytokines showed differences between daylength/temperature periods when focusing on their total amount in the ejaculate. No strong relationship explaining more than 10% of the total variance was found between annual fluctuations in SP cytokine levels and sperm parameters. In conclusion, the period of the year during which ejaculate was collected helps explain the intra-male variability of SP cytokines in breeding boars.

Keywords: cytokines, intra-male variability, pig, seasonality, seminal plasma

1. Introduction

Seminal plasma (SP), a complex fluid mainly secreted from the epididymus and the accessory sex glands, contains many bioactive components, particularly proteins and peptides [1–3]. These SP proteins and peptides play a key role in regulating both sperm function (i.e., fertilizing ability, and in the uterine immune environment once deposited into the female genital tract [4–6]). Consequently, the SP proteins are routinely being explored for potential biomarkers of male fertility [7–9].

The SP proteins include cytokines, small proteins that have acquired gene by reproductive interest in recent years because some of them are directly involved in the regulation of the immune environment of the female genital tract and, thereby, they play a key role in development and embryo-implantation [10,11]. Moreover, some SP cytokines are also involved in sperm function [11,12].

3

frontiers
in Veterinary Science

Seminal Plasma Cytokines Are Predictive of the Outcome of Boar Sperm Preservation

Isabel Martínez^{1,2}, Lorena Padilla^{1,2}, Cristina Ferrás^{1,2}, José M. Vázquez¹, Emilio A. Martínez¹, Herberto Rodríguez-Martínez^{1,2}, José Rosa^{1,2,3*} and Susana Peña^{1,2,3}

Background: Boar seminal plasma is rich in cytokines, which could influence the capacity of spermatozoa to tolerate preservation.

Objective: To evaluate the relationship of boar seminal plasma cytokines in the changes experienced by boar spermatozoa during storage, either in liquid or frozen state.

Materials and Methods: In two separate experiments, semen samples from healthy and fertile boars were split in two aliquots, one centrifuged before (LSD, up to 10 days) to harvest seminal plasma, whereas the other was either conventionally stored (2°C or -80°C spermatozoa) and kept stored at 17°C during 444 h ($n = 20$, Experiment 1) or frozen frozen using a standard 0.5 mL, pre-cooled, protectant $n = 27$, Experiment 2). Spermatozoa were quantified using Luminex[®] xMAP[®] system. Epididymal CGC2-evaluated total and progressive motility, low cytotoxicity evaluated sperm viability, production of intracellular ROS and OS² and levels of lipid peroxidation in male spermatozoa were measured either at 0, 12, 24, 444 h of liquid storage (Experiment 1) or before freezing and at 30- and 100-min post-freezing (Experiment 2).

Results: Multiple linear regression models, with Bayesian approach for variable selection, revealed that the variables inflammatory TGF- β 2, TGF- β 1, IL-1 α , and IL-4 and the pro-inflammatory IL-1 and IL-1 β predicted changes in sperm motility for liquid stored semen while low oxidative stress (OS²) was included in the models predicting changes in all sperm attributes for cryopreserved semen.

Conclusion: Specific boar seminal plasma cytokines would contribute to evaluate the structural and metabolic changes observed in spermatozoa during preservation, either in liquid or frozen state.

Keywords: seminal plasma, cytokines, spermatozoa, liquid storage, cryopreservation, pig

1. Introduction

Cytokines comprise a family of ubiquitous low molecular weight proteins released mainly by immune cells, regulating cellular migration of multiple cellular functions [1]. Cytokines are also produced by a wide variety of cells in both male and female genital tract, which are released in genital fluids [2–4]. As such, a repertoire of cytokines has been identified in

4

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is fully expressed in the genital tract, seminal plasma and spermatozoa of male pigs

Lorena Padilla^{1,2}, Isabel Martínez-Hernández^{1,2}, Isabel Barrocas^{1,2}, Ximena López^{1,2}, Luis M. Pastor^{1,2}, Herberto Rodríguez-Martínez^{1,2}, José Rosa^{1,2,3*} and Ximena López^{1,2}

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is an inflammatory cytokine identified in boar seminal plasma (SP) but until now unexplored in terms of place of production and its expression in spermatozoa. This study aimed to explore these aspects by measuring the presence of GM-CSF in positive reproductive organs (testes, epididymis and accessory sex glands), SP and semen spermatozoa from such epididymis and identified using quantitative real-time PCR, immunofluorescence and immunocytochemistry. Positive labeling was obtained in testes, SP and spermatozoa in reproductive organs, WB analyzed the forms of GM-CSF with different glycosylation degrees (S1 and 4S2) in SP and epididymal fluid, the GM-CSF appeared only in its active form while in spermatozoa the GM-CSF was present in its inactive form. Non-reducing spermatozoa showed more GM-CSF than viable spermatozoa (24.8 ± 1.88 IU vs. 23.6 ± 1.32 IU) of fluorescence intensity. In conclusion, GM-CSF is widely present in the reproductive tract of male pigs, affected to the spermatozoa already in the epididymis as well as varied to SP. Consequently, the GM-CSF might regulate male genital tract and sperm function as well as mediating initial inflammatory response and further stimulating later immune actions by the female to semen deposition.

When boar testicular semen samples are hardly capable to identify sub-fertile sows' fertility defects (hermaphroditism) in the female genital tract, it is necessary to investigate the role of cytokines in the regulation of the female immune environment once deposited into the female genital tract [4–6]). Consequently, the SP proteins are routinely being explored for potential biomarkers of male fertility [7–9].

The SP proteins include cytokines, small proteins that have acquired gene by reproductive interest in recent years because some of them are directly involved in the regulation of the immune environment of the female genital tract and, thereby, they play a key role in development and embryo-implantation [10,11]. Moreover, some SP cytokines are also involved in sperm function [11,12].

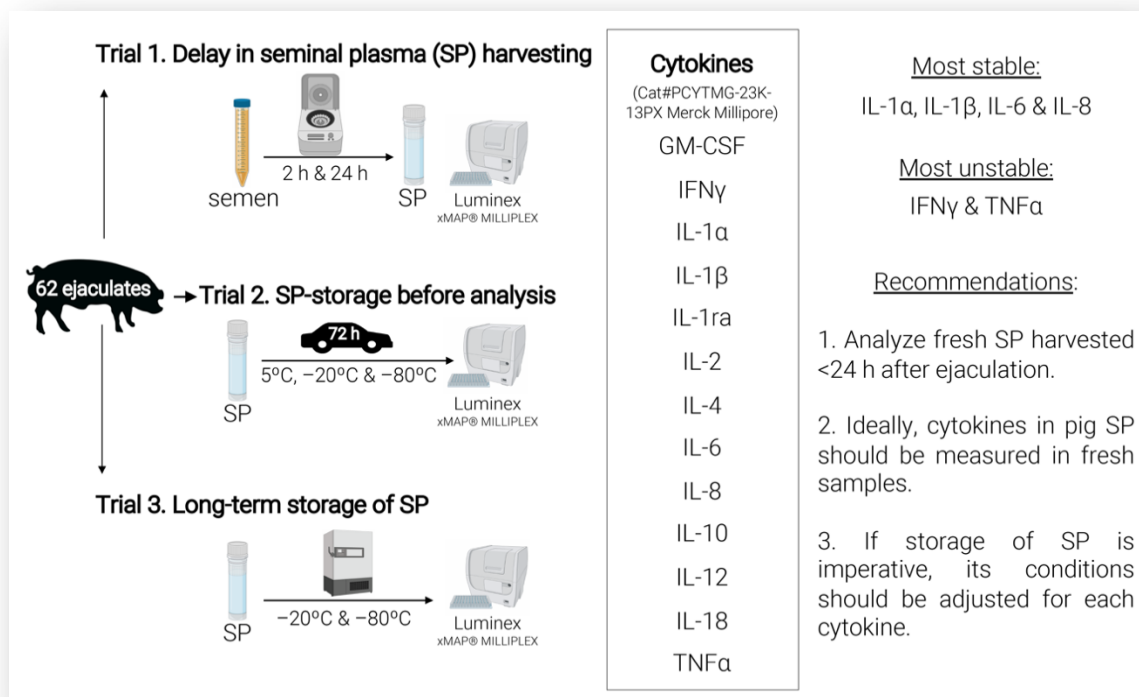
Article 1

Article 1

Biology 2020 9, 276; 10.3390/biology9090276

Measurable cytokine concentrations in pig seminal plasma are modified by semen handling and storage. Padilla L, Barranco I, Parrilla I, Lucas X, Rodriguez-Martinez H, Roca J.

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32906591>



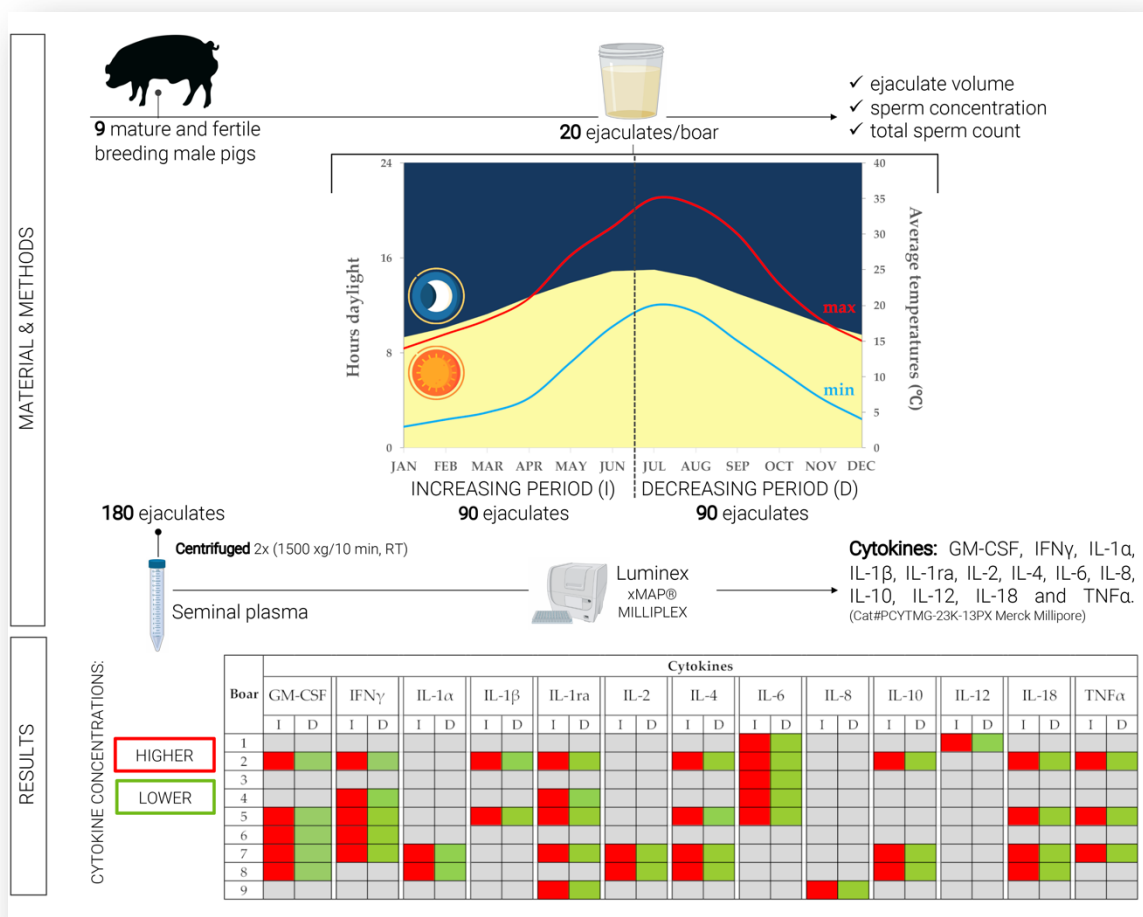
Article 2

Article 2

Biology 2020, 9, 105; doi:10.3390/biology9050105.

Period of boar ejaculate collection contributes to the yearly intra-male variability of seminal plasma cytokines. Padilla L, Lucas X, Parrilla I, Perez-Patiño C, Rodríguez-Martínez H, Roca J, Barranco I.

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32906591/>



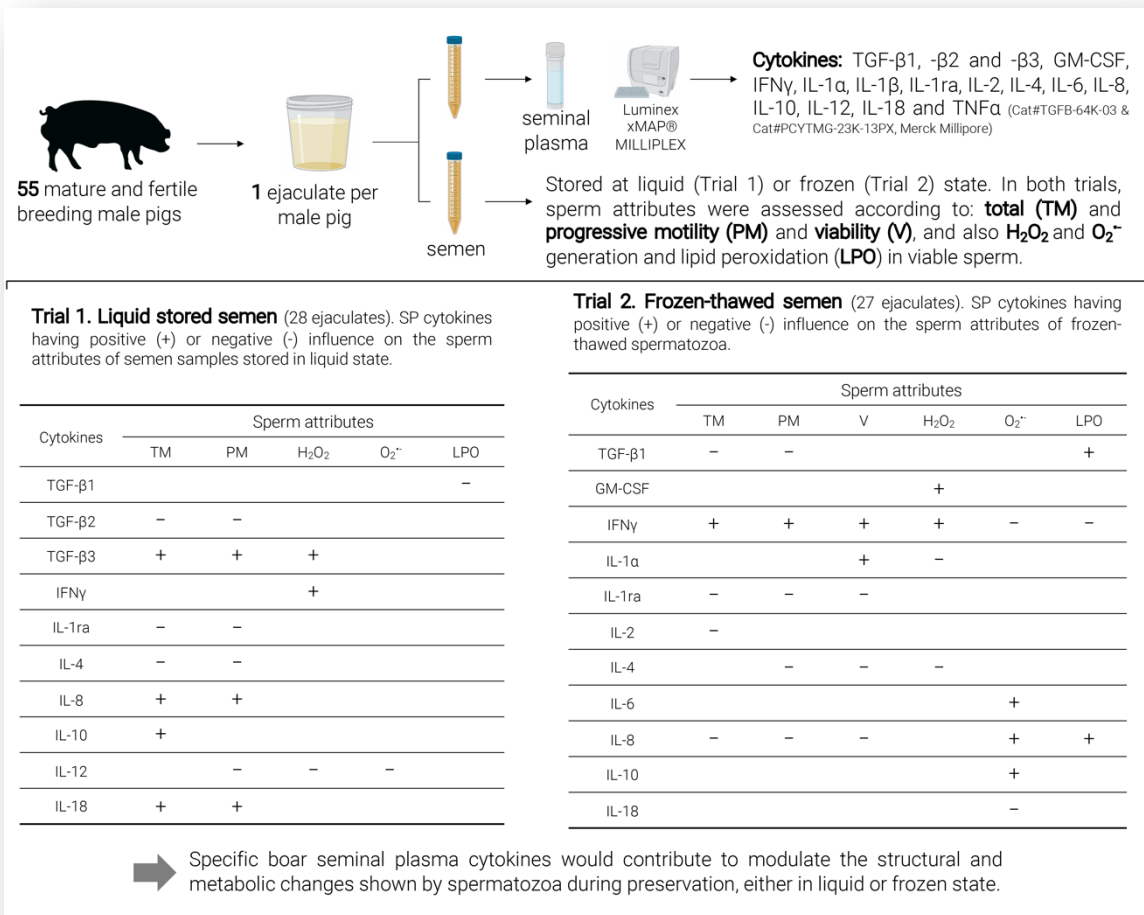
Article 3

Article 3

Frontiers in Veterinary Science, 2019, 4:6:436; doi:
10.3389/fvets.2019.00436.

Seminal plasma cytokines are predictive of the outcome of boar sperm preservation. Barranco I, Padilla L, Pérez-Patiño C, Vazquez JM, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J, Parrilla I.

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31867346/>



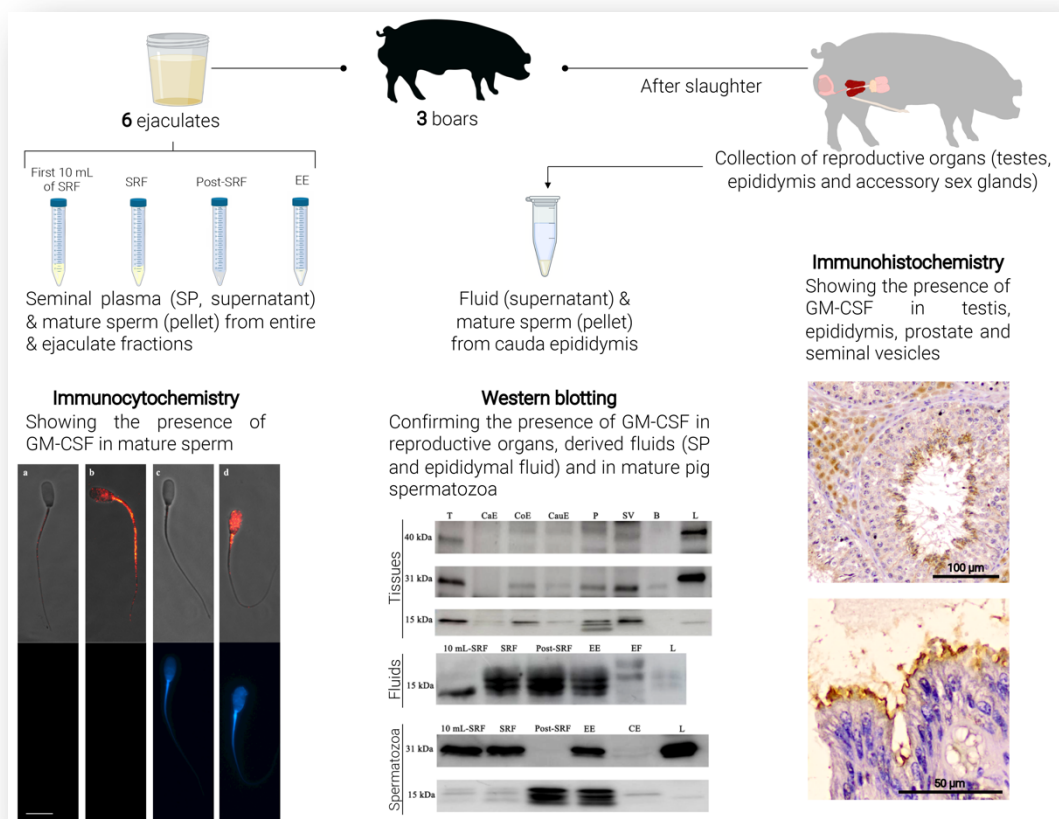
Article 4

Article 4

Scientific reports, 2020, 10(1), 13360; doi: 10.1038/s41598-020-70302-9.

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is fully expressed in the genital tract, seminal plasma and spermatozoa of male pigs. Padilla, L, Martínez-Hernández, J, Barranco, I, Lucas, X, Pastor, L. M, Rodriguez-Martínez, H, Roca, J, Parrilla, I. Scientific reports, 2020, 10(1), 13360; doi: 10.1038/s41598-020-70302-9.

URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32770046/>



Graphic appendix

Graphic appendix

Figure 1. Pig artificial insemination center where boar ejaculates were collected. Outside (A) and inside (B) views of the artificial insemination center located in Calasparra (Murcia) and belonging to AIM Iberica (Topigs Norsvin España, Madrid, Spain). C, The gloved hand method for the separate collection of the ejaculate fractions: first 10 mL of sperm rich fraction (SRF), rest of SRF and post-SRF. D, semi-automatic method (Collectis®, IMV Technologies, L'Aigle, France) for the collection of entire ejaculates.

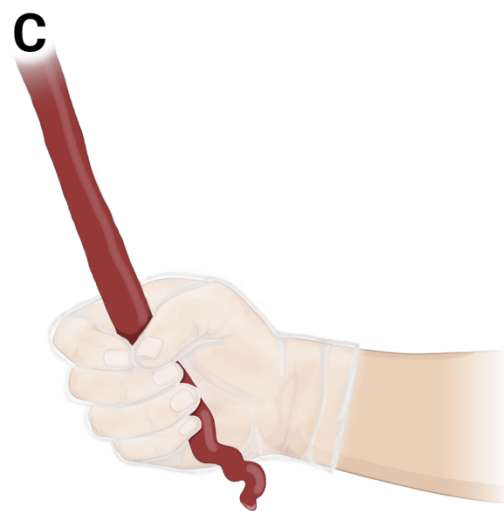


Figure 2. Harvest and storage of seminal plasma samples. **A**, a 15-mL centrifuge tube with semen. **B**, centrifuge (Rotofix 32A; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). **C**, a 15-mL centrifuge tube after double centrifugation (1,500xg for 10 min at RT) showing seminal plasma (supernatant) and sperm (pellet) **D**, a cryotube containing seminal plasma. **E**, Equipments used for storing seminal plasma samples; from left to right, -80°C freezer (Ultra-Low Freezer; Haier, Qingdao, China), 4°C refrigerator (Zanussi Tropic System, Electrolux España S.A.U, Madrid, Spain), -20°C freezer (Zanussi Tropic System) and 17°C refrigerator (FOC 120E Connect Cooled Incubator,VELP Scientific, Inc, NY, USA).

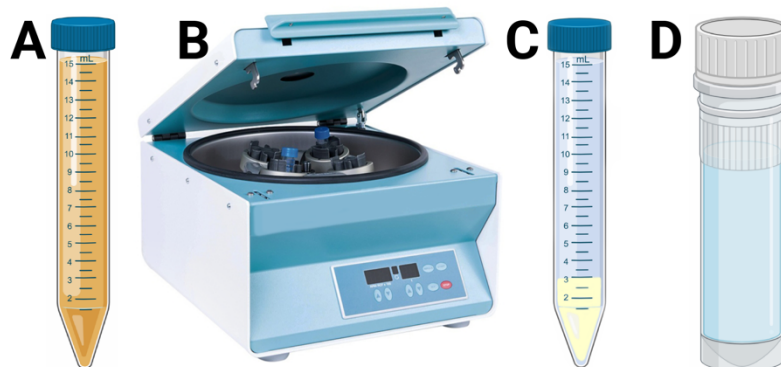


Figure 3. Quality and sperm functionality assessments. **A**, computer assisted sperm analyzer (CASA, ISADV1, Proiser R+D SL, Paterna, Spain) for evaluating total and progressive sperm motility. **B**, Dot Plots and Histograms generated using a flow cytometer analyzer (1; BD FACS Canto II cytometer, Becton Dickinson Co, Franklin Lakes, NJ, USA); (2) FSC-SSC dot plot with the gate placed to exclude debris; (3) Gate (P2) placed to select sperm population in basis to H-42 positive fluorescence and applied to all the analyses performed; (4) Integrity of plasma and acrosomal membranes (fluorochromes: propidium iodide [PI] and fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin [PNA-FITC]); viable sperm with intact acrosome : PI-/FITC-PNA; (5) Intracellular H_2O_2 generation in viable sperm (fluorochromes: PI and 5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA; viable sperm population generating H_2O_2 : PI-/DCF+); (6) Intracellular $O_2^{\cdot-}$ generation in viable sperm (fluorochromes: PI and DHE (poner nombre completo); viable sperm generating intracellular $O_2^{\cdot-}$: Sitox-/DHE+. (7 and 8) Lipid peroxidation of sperm plasma membrane (fluorochromes: PI and BODIPY 581/591 C₁₁); viable sperm population (7; PI-) gated and showing lipid peroxidation of plasma membrane (8; BODIPY+). FSC: Forward Scatter Signal; SSC: Side Scatter signal; Pacific Blue: blue fluorescence; PerCP-Cy5-5-A: red fluorescence; FITC: green fluorescence.

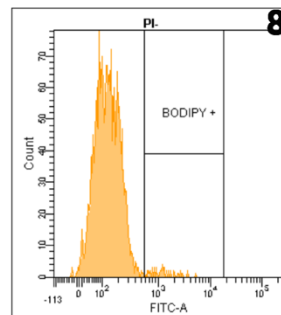
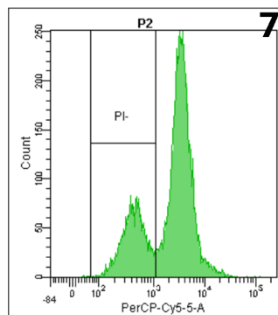
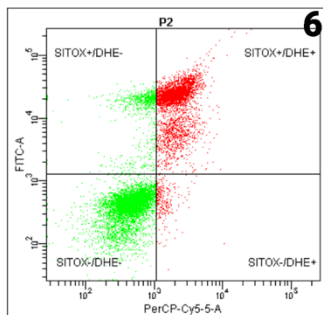
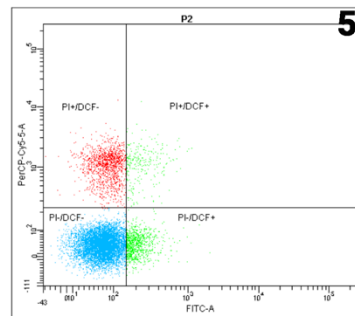
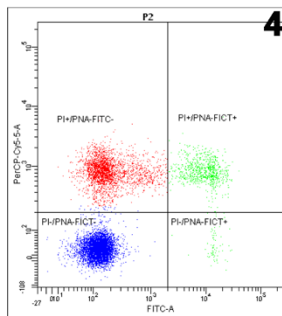
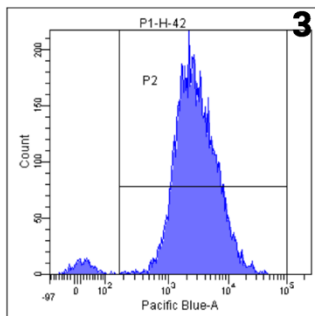
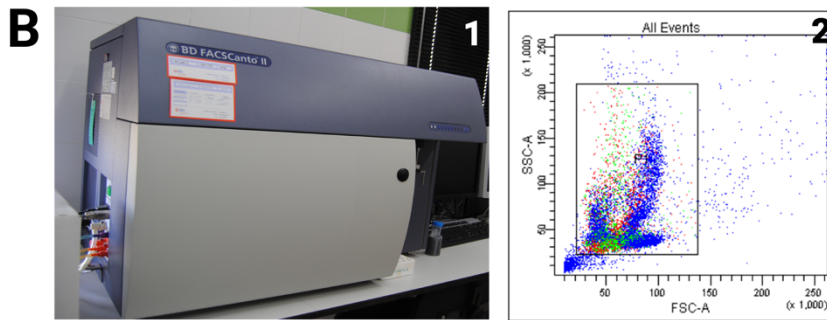
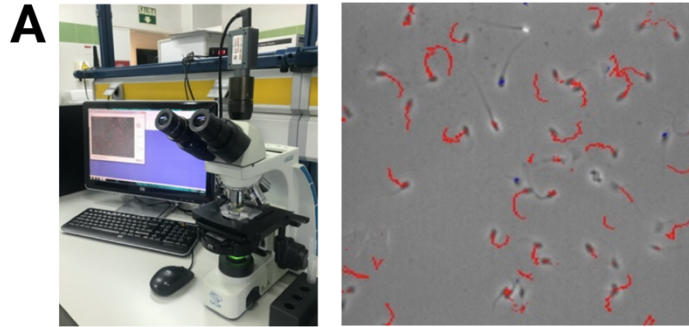


Figure 4. Immunohistochemistry of reproductive tissues by using the avidin.biotin-complex method. **A**, The boar reproductive organs obtained in slaughterhouse and used in the analysis: testes, epididymides, prostate, seminal vesicles and bulbourethral gland. **B**, tissue sample fixed in bouin solution; **C**, tissue samples emebbed in parafin blocks; **D**, Slide incubated with primary (GM-CSF polyclonal rabbit orb6090) and secondary antibody (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, biotin-SP conjugate) and ready to microscopy evaluation after haematoxylin staining.

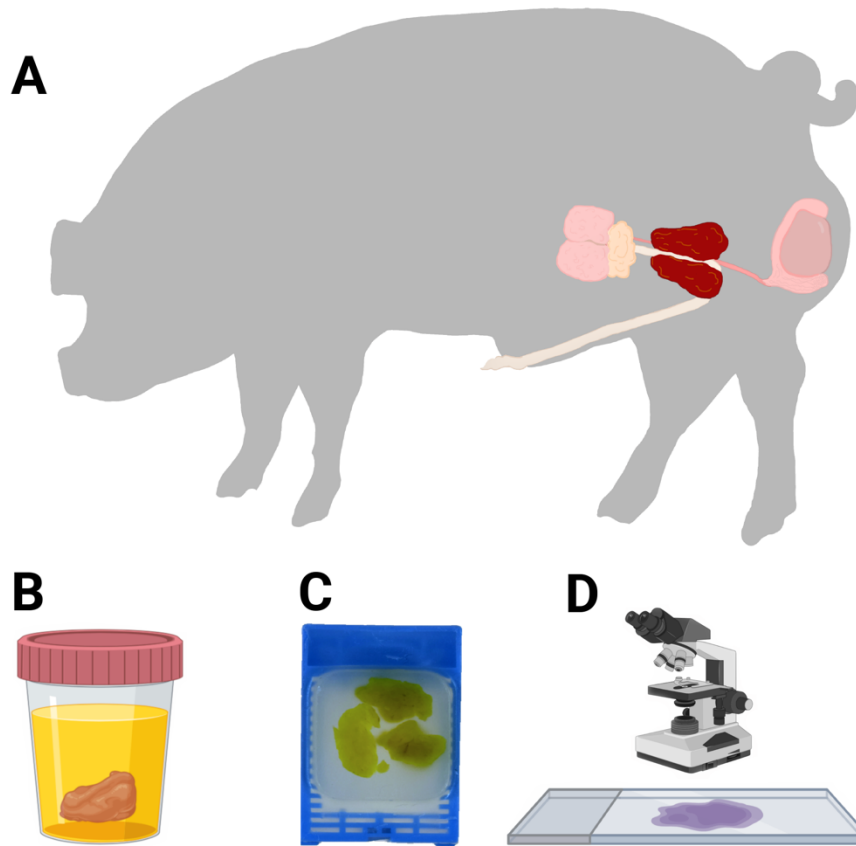


Figure 5. Sperm immunocytochemistry. **A**, sperm pellet obtained by double centrifugation (800xg for 8 min at RT). **B**, sperm extended in smears over poly-L-lysine slides. **C**, fluorescence microscope (Nikon Eclipse E800, Nikon Instruments Corporation, Melville, NY, USA). **D**, sperm showing different fluorescence intensity analyzed with Image J software.

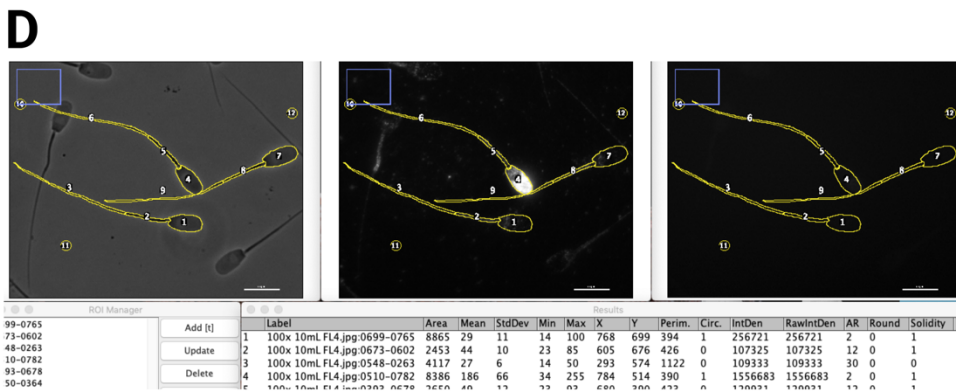
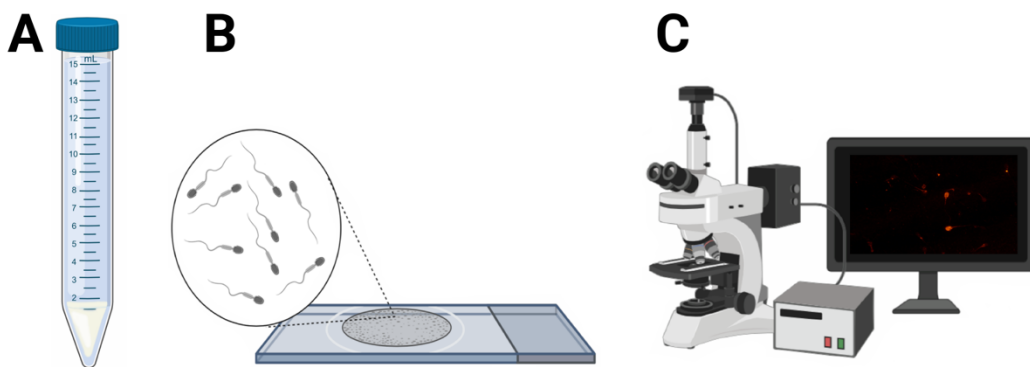
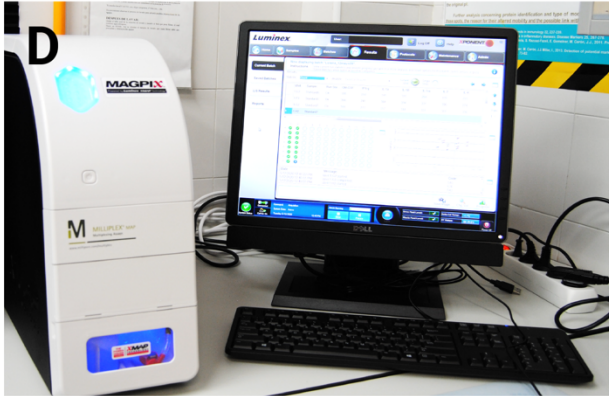
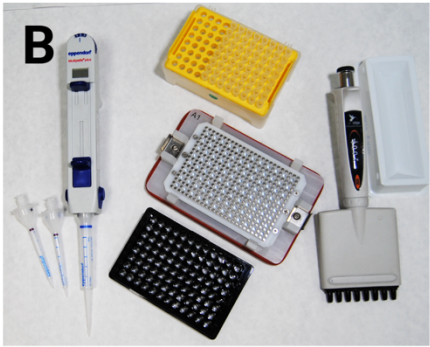
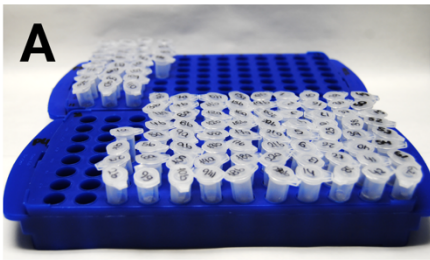


Figure 6. Cytokine measurement in seminal plasma samples using LUMINEX technology. **A**, seminal plasma samples in Eppendorf tubes thawed at room temperature. **B**, magnet plate and different pipettes used to immunoassay procedure. **C**, commercial multiplex kit used to analyze a total of 13 cytokines. **D**, MAGPIX® (Luminexcorp, Austin, TX, USA) with xPONENT software version 4.2 (Luminexcorp) for running plates and acquisition and MILLIPLEX® Analyst Version 5.1 for data analysis (Merck Millipore).



Appendix

Appendix

InCites Journal Citation Reports Clarivate Analytics

2019 Journal Performance Data for: Biology-Basel

ISSN: ****-****
 eISSN: 2079-7737
 MDPI
 ST ALBAN-ANLAGE 66, CH-4052 BASEL, SWITZERLAND
 SWITZERLAND

TITLES
 ISO: Biology-Basel
 JCR Abbrev: BIOLOGY-BASEL

LANGUAGES
 English

CATEGORIES
 BIOLOGY -- SCIE

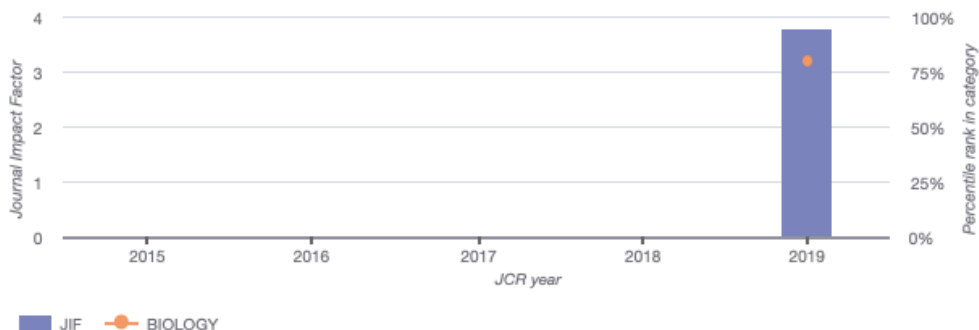
PUBLICATION FREQUENCY
 4 issues/year

 Open Access from 2012

2019 Journal Impact Factor & percentile rank in category for: Biology-Basel

3.796

2019 Journal Impact Factor



JCR Impact Factor

JCR Year	BIOLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	19/93	Q1	80.108

2019 Journal Performance Data for: Frontiers in Veterinary Science


ISSN: ****_****
 eISSN: 2297-1769
 FRONTIERS MEDIA SA
 AVENUE DU TRIBUNAL FEDERAL 34, LAUSANNE CH-1015, SWITZERLAND
 SWITZERLAND

TITLES
 ISO: Front. Vet. Sci.
 JCR Abbrev: FRONT VET SCI

LANGUAGES
 English

CATEGORIES
 VETERINARY SCIENCES --
 SCIE

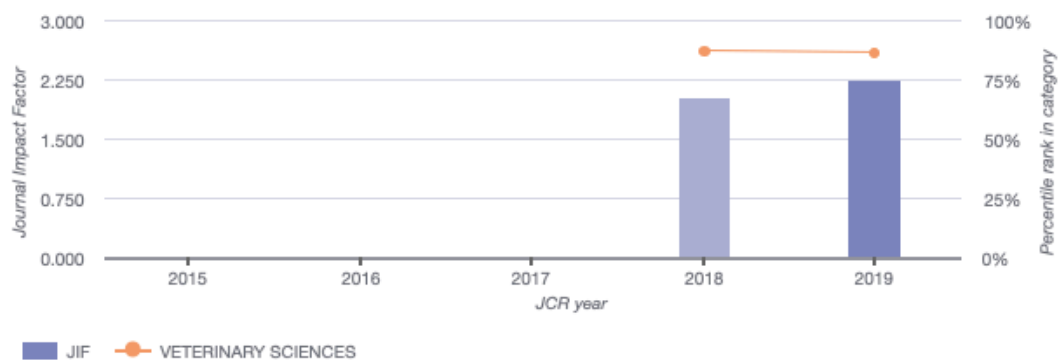
PUBLICATION FREQUENCY
 1 issue/year

 Open Access from 2014

2019 Journal Impact Factor & percentile rank in category for: Frontiers in Veterinary Science

2.245

2019 Journal Impact Factor



JCR Impact Factor

JCR Year	VETERINARY SCIENCES		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	19/141	Q1	86.879
2018	18/141	Q1	87.589

2019 Journal Performance Data for: Scientific Reports

ISSN: 2045-2322
 eISSN: 2045-2322
 NATURE PUBLISHING GROUP
 MACMILLAN BUILDING, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND
 ENGLAND

TITLES
 ISO: Sci Rep
 JCR Abbrev: SCI REP-UK

CATEGORIES
 MULTIDISCIPLINARY
 SCIENCES -- SCIE

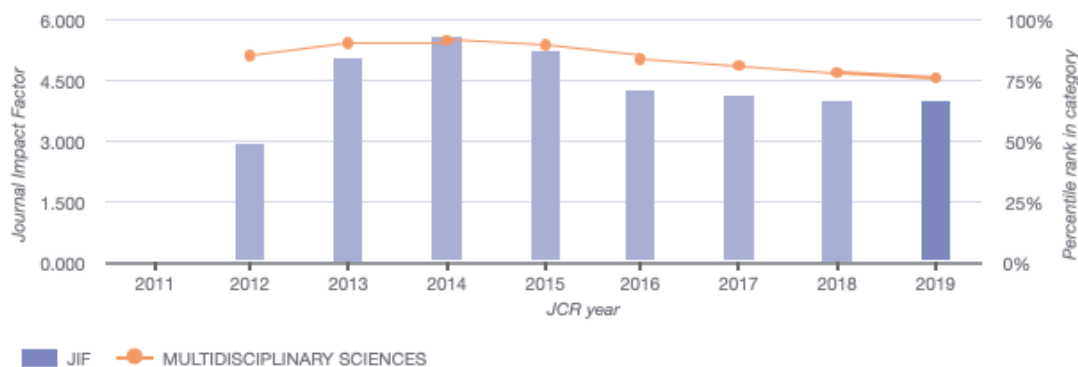
LANGUAGES
 English

 Open Access from 2011

2019 Journal Impact Factor & percentile rank in category for: Scientific Reports

3.998

2019 Journal Impact Factor



JCR Impact Factor

JCR Year	MULTIDISCIPLINARY SCIENCES		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2019	17/71	Q1	76.761
2018	15/69	Q1	78.986
2017	12/64	Q1	82.031
2016	10/64	Q1	85.156
2015	7/63	Q1	89.683
2014	5/57	Q1	92.105
2013	5/55	Q1	91.818
2012	8/56	Q1	86.607

