



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

**Antioxidantes del Plasma Seminal: Potenciales  
Biomarcadores de Fertilidad en Verracos Incluidos en  
Programas de Inseminación Artificial**

**D<sup>a</sup> Isabel Barranco Cascales**

2017





D. Jordi Roca Aleu, Catedrático del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia (España) y D. Heriberto Rodríguez Martínez, Catedrático del Departamento de Medicina Clínica y Experimental de la Universidad de Linköping (Suecia),

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Antioxidantes del plasma seminal: potenciales biomarcadores de fertilidad en verracos incluidos en programas de inseminación artificial (Seminal plasma antioxidants as potential fertility biomarkers in boars used in artificial insemination programs)**" realizada por D. **Isabel Barranco Cascales**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 6 de Junio de 2017

A blue ink signature consisting of several vertical, wavy strokes.

Fdo.: Jordi Roca Aleu

A blue ink signature with a large, circular flourish at the beginning and a horizontal line extending to the right.

Fdo.: Heriberto Rodríguez Martínez



**TESIS DOCTORAL**  
**POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES**  
PhD THESIS BY PUBLICATIONS



# TESIS DOCTORAL

## POR COMPENDIO DE PUBLICACIONES

PhD THESIS BY PUBLICATIONS

ARTÍCULO  
PAPER

1

**High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility.** Barranco I, Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Parrilla I, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. Scientific Reports. 2015. 5:18538.

ARTÍCULO  
PAPER

2

**Measurement of activity and concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates.** Barranco I, Roca J, Tvarijonaviciute A, Rubér M, Vicente-Carrillo A, Atikuzzaman M, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H. Molecular Reproduction and Development. 2015. 82:58-65.

ARTÍCULO  
PAPER

3

**The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility.** Barranco I, Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Alkmin DV, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. Andrology. 2015. 3:315-320.

ARTÍCULO  
PAPER

4

**Glutathione peroxidase 5 is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and in vivo fertility.** Barranco I, Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Vicente-Carrillo A, Parrilla I, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J. PLoS One. 2016. 11:e0162958.

ARTÍCULO  
PAPER

5

**Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs.** Barranco I, Casao A, Pérez-Patiño C, Parrilla I, Muiño-Blanco T, Martínez EA, Cebrián-Perez JA, Roca J. Journal of Animal Science. 2017. 95: 1660-1668.







UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. Fernando Tecles Vicente, Profesor Titular de Universidad del Área de Medicina y Cirugía Animal y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** \* Tecnología de la Reproducción y Medicina veterinarias, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Antioxidantes del plasma seminal: potenciales biomarcadores de fertilidad en verracos incluidos en programas de inseminación artificial", realizada por D<sup>a</sup> Isabel Barranco Cascales, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Jordi Roca Aleu y D. Heriberto Rodríguez Martínez, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 12 de junio de 2017, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 12 de junio de 2017



**Doctorando: D<sup>a</sup>. ISABEL BARRANCO CASCALES**

**Mod: T-40**





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Vicerrectorado de  
Planificación de Enseñanzas

**D<sup>a</sup> Isabel Barranco Cascales**  
**C/ Manuel de Falla, 7**  
**30730 San Javier**  
**Murcia**

Vista la solicitud presentada el día 7 de junio de 2017, por D<sup>a</sup> Isabel Barranco Cascales con DNI: 48548882E, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Tecnología de la Reproducción y Medicina Veterinarias, y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias de la Salud

resolvió, en su sesión de 8 de junio de 2017, **ACCEDER** a lo solicitado por la interesada pudiendo, por tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones, con los siguientes artículos:

1. HIGH TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE PORCINE SEMINAL PLASMA (SP-TAC) RELATES TO SPERM SURVIVAL AND FERTILITY.
2. MEASUREMENT OF ACTIVITY AND CONCENTRATION OF PARAOXONASE 1 (PON-1) IN SEMINAL PLASMA AND IDENTIFICATION OF PON-2 IN THE SPERM OF BOAR EJACULATES.
3. THE ACTIVITY OF PARAOXONASE TYPE 1 (PON-1) IN BOAR SEMINAL PLASMA AND ITS RELATIONSHIP WITH SPERM QUALITY, FUNCTIONALITY, AND IN VIVO FERTILITY.
4. GLUTATHIONE PEROXIDASE 5 IS EXPRESSED BY THE ENTIRE PIG MALE GENITAL TRACT AND ONCE IN THE SEMINAL PLASMA CONTRIBUTES TO SPERM SURVIVAL AND IN VIVO FERTILITY.
5. PROFILE AND REPRODUCTIVE ROLES OF SEMINAL PLASMA MELATONIN OF BOAR EJACULATES USED IN ARTIFICIAL INSEMINATION PROGRAMS.

La presente resolución no pone fin a la vía administrativa. Frente a ella, de conformidad con lo previsto en el capítulo II del título V de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas y en el artículo 21 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, aprobados por Decreto 85/2004, de 27 de agosto, los interesados pueden interponer recurso de alzada ante el Rector de la Universidad de Murcia, en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente al de la notificación o publicación, sin perjuicio de que puedan intentar cualquier otro recurso que a su derecho convenga.

Lo que en cumplimiento del artículo 40.1 de la vigente Ley 39/2015, de 1 de octubre del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, se notifica a D<sup>a</sup> ISABEL BARRANCO CASCALES.

Murcia a 8 de junio de 2017  
Vicerrector de Planificación de Enseñanzas, y  
Presidente de la Comisión General de Doctorado

José Manuel Mira Ros





Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Kliniska Vetenskaper  
Margareta Wallgren

1(2)

## To whom it may concern

I have reviewed the work performed by Ms Isabel Barranco Cascales for her PhD thesis entitled "Seminal plasma antioxidants as potential fertility biomarkers in boars used in artificial insemination programs Antioxidantes del plasma seminal: potenciales biomarcadores de fertilidad en verracos incluidos en programas de inseminación artificial". The thesis is of a coat type built upon five articles published in international ranked journals with peer-review system. The candidate is 1st author in all 5 papers included in the thesis.

1-High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Parilla I, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H & Roca J. (2015). *Scientific Reports*, 5:18538, DOI:10.1038/srep18538.

2-Measurements of activity and concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. Barranco I, Roca J, Tvarijonaviciute A, Rubér M, Vicente-Carrillo A, Atikuzzaman M, Ceron JJ, Martinez AE, Rodriguez-Martinez H. (2015) *Mol. Reprod. & Dev.*82:58-65.

3-The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Alkmin, DV, Ceron JJ, Martinez AE, Rodriguez-Martinez H & Roca J. (2015) *Andrology*, 3, 315-320.

4-Glutathione peroxidase is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and in vivo fertility.. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Vicente-Carrillo A, Parilla I, Ceron JJ, Martinez AE, Rodriguez-Martinez H & Roca J. (2016). *PLOS one*, DOI:10.1371/journal.pone.0162958.

5-Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs. Barranco I, Casao A, Perez-Patino C, Parilla I, Muino-Blanco T, Martinez AE, Cebrian-Perez JA & Roca J. (2017). *J.Anim.Sci.* 2017,95:1-9.

[Titel]

The coat contains an introduction, general objectives and a summary including methodological considerations, experimental design and results followed by general conclusions, abbreviations and references. Finally there is also a nice graphic appendix.

In her thesis the Candidate has studied a topic which is up to date in the field of boar semen collection and handling. New techniques has been introduced, semi-automatic semen collection systems, in to the boar studs and this has resulted in changes in the composition of the ejaculates. Boar spermatozoa are susceptible to oxidative stress due to a restricted antioxidant defense in their cytoplasm and a large proportion of polyunsaturated fatty acids in their plasma membranes. Collection of different fractions of the ejaculate is not easy with todays semen collection techniques. Thus it is important to do as the Candidate look at seminalplasma components with antioxidant properties to find ways to protect the spermatozoa from oxidative stress. The material and methods included are clearly designed and the results that follows are clearly presented as well as the results put in the context of current literature and discussed paper by paper is easy to follow and the candidate conclusions are relevant.

On the basis if the considerations above, I fully support Ms Isabel Barranco Cascales candidacy to the European Doctorate

  
Margareta Wallgren (DVM, PhD)  
Department of Clinical Sciences,  
Swedish university of Agticultural Sciences,  
Uppsala, Sweden

2017-06-13

To whom it may concern

I have reviewed the work performed by Ms Isabel Barranco for her PhD thesis entitled "Seminal plasma antioxidants as potential fertility biomarkers in boars used in artificial insemination programs".

"Antioxidantes del plasma seminal: potenciales biomarcadores de fertilidad en verracos incluidos en programas de inseminación artificial".

The thesis is of a coat type built upon the following five articles published in international ranked journals with peer-review system and documented bibliometric indicators:

1. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Parilla I, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J. *Scientific Reports*. 2015. 5:18538.
2. Measurement of activity and concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. Barranco I, Roca J, Tvarijonaviciute A, Ruber M, Vicente-Carillo A, Atikuzzaman M, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H. *Molecular Reproduction and Development*. 2015. 82:58-65.
3. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Alkmin DV, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J. *Andrology*. 2015. 3:315-320.
4. Glutathione peroxidase 5 is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and in vivo fertility. Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patino C, Vicente-Carillo A, Parilla I, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J. *PLoS One*. 2016. 11:e0162958.
5. Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs. Barranco I, Casao A, Perez-Patino C, Parilla I, Muino-Blanco T, Martinez EA, Cebrian-Perez JA, Roca J. *Journal of Animal Science*. 2017. 95: 1660-1668.

The coat contains an introduction, a summary, materials and methods, experimental designs and results, conclusions, a reference list and each one of the papers included in the thesis (1-5) and graphics of relevant illustrations.

In her thesis the Candidate has studied a topic that is timely and up to date in the field of andrology - semen plasma antioxidants as potential biomarkers in boars used in artificial insemination programs.

Some selected shortened conclusions based on the results of this study include:

- The total antioxidant capacity of seminal plasma differs among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate.
- All boar genital organs are able to express the enzyme glutathione peroxidase 5.
- Melatonin concentration in boar seminal plasma exhibits a seasonal pattern, with ejaculates collected during increasing day length period of year showing the highest concentrations.

- The total antioxidant capacity, the activity of paraoxonase type 1 and the concentration of glutathione peroxidase 5 in boar seminal plasma are positively related with fertility parameters (in terms of farrowing rate and/or litter size) and could be considered as potential fertility biomarkers.

The material and methods used in this study are sound and well described. Data were correctly analyzed with relevant methodology and were clearly presented and well-illustrated. The meanings of the results were clearly put in the context of the current literature and were correctly discussed in each paper.

The Candidate is the first author in each of the five publications indicating that she has had a major role in every study. "Seminal plasma antioxidants as potential fertility biomarkers in boars used in artificial insemination programs" is an excellent title for the study.

The average impact factor of the five papers is high!

On the basis of the considerations above, I fully support Ms Isabel Barranco's candidacy to the European Doctorate.

*Magnus Andersson*  
Prof Dr Magnus Andersson

Department Of Production Animal Medicine  
Faculty of Veterinary Medicine  
University of Helsinki  
Finland







# The University of Sydney

Faculty of Veterinary Science  
University of Sydney  
NSW 2006, Australia

June 09, 2017

W.M.C. Maxwell AM  
Emeritus Professor of Reproductive Biology

Telephone +61 2 9484 6676  
Email: [chis.maxwell@sydney.edu.au](mailto:chis.maxwell@sydney.edu.au)

Professor Jordi Roca (DVM, PhD, Dipl ECAR & ECPHM)  
Department of Medicine and Animal Surgery  
Faculty of Veterinary Science  
University of Murcia  
Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Dear Professor Roca

**PhD Examination: Isabel Barranco Cascales**  
**Seminal plasma antioxidants as potential fertility biomarkers in boars used in artificial insemination programs**

The work presented in the papers and preamble comprising this thesis represents a substantial contribution to the understanding of boar seminal plasma function, and particularly the relevance of certain components with antioxidant activity to the porcine artificial insemination (AI) industry. Boar spermatozoa are subjected to various stresses when they are collected, processed and stored by various means before they are placed in the female reproductive tract at the time of AI. Moreover, the industry places pressures on boar studs to produce more ejaculates from fewer boars in order to increase the rate of genetic improvement. Therefore, it is critical that the stressors are minimised and that fertility of boars is maximised. Many semen parameters have been assessed in an attempt to elucidate those, which could be used as markers of boar fertility, and there has been some success in the elimination of infertility. Nevertheless, considerable variation in boar fertility remains, ranging into subfertility, as assessed in terms of farrowing rates and litter sizes in sows after AI.

The identification and elimination of sub-fertile boars through assessment of seminal plasma characteristics was a broad aim of this study, but it was focused on components with antioxidant properties. The first part of the study established the total antioxidant capacity of seminal plasma (SP-TAC) and its relationship with sperm quality, function and fertility. Once these relationships had been determined, the remainder of the study focused on the specific antioxidant components paraoxinase types 1 and 2 (PON-1, PON-2), glutathione peroxidase 5 (GPX5) and melatonin (MLT). Seventeen experiments over five scientific articles highlighted unique aspects of these components and quantified the variation in their

contributions between boars, ejaculates within boars, sperm fractions within ejaculates and, in the case of MLT, seasonal effects. Assessments made included sperm quality and function, and fertility parameters. The enzymes PON-1 and GPX5 were identified and quantified for the first time, and PON-2 localised on the sperm head; in the case of GPX5, its sites of expression in the male genital tract were identified; a relationship between PON-1 total cholesterol was established. New knowledge was presented on the origins and potential protective functions of these antioxidants, previously little-examined in boar semen, and on their potential as biomarkers of fertility. These findings alone are an important and novel contribution to knowledge on the function of boar spermatozoa to be used for AI of sows.

This is an impressive and practical study. From a scientific perspective, the aims/hypotheses are clearly stated and the conclusions drawn are clear and valid. The overall limitations of the findings are fully acknowledged and the main conclusions drawn are valid and conservative. However, this examiner believes the results of these experiments are important. The studies were extensive and used large numbers of boars and, particularly, ejaculates and females inseminated. Accordingly, the results are of commercial significance to the porcine industry.

The English versions of the Summary and Conclusions of the thesis are clear and well written. A small number of minor errors of grammar are present in these sections, but they are minimal, and I do not believe they require any correction or emendation of the document.

All the work has been published as five articles, for all of which the student is senior author, in very prestigious international journals. I have little comment to make about these articles, apart from mentioning that they have already been subjected to rigorous international peer review, and therefore require no further review by this examiner. I note the high to very high Impact Factors of the journals chosen for publication, as evidence of the quality of the work. The content of the articles is very well set out and explained in the Extended Summary presented at the beginning of the thesis. Nevertheless, these articles do represent a substantial body of research work, carried out by the candidate and co-workers, and provide strong evidence of research and scientific writing ability.

Having read the thesis and the incorporated journal articles, I have no hesitation in recommending without reservation the award of the degree of PhD. I congratulate the student on a fine piece of work.

Yours sincerely



Chis Maxwell AM  
Emeritus Professor of Reproductive Biology

DEPARTMENT OF CLINICAL & EXPERIMENTAL MEDICINE    Date 2017-04-18  
PROFESSOR HERIBERTO RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ

## Universidad de Murcia

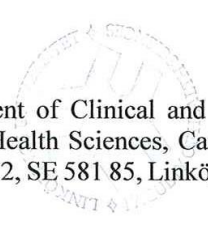
### To whom it may concern

This is to certify that *Mrs Isabel Barranco Cascales*, PhD-student at the University of Murcia, carried out a period of training and research at the Department of Clinical & Experimental Medicine (IKE), under my supervision between May 2 and August 2 of 2015. Mrs Barranco successfully learned and carried out studies of the immunohistochemistry of the enzymes Paraoxonase-1 (PON-1) and Glutathione peroxidase-5 (GPX-5) in the tissues of domestic boars. After obtaining the results of the immunohistochemistry, Mrs Barranco summarized these and wrote several manuscripts, with the undersigned as co-author, as well as peer-reviewed abstracts in scientific events. Mrs Barranco was diligent, highly interested in her tasks and successfully adjoined our research group under her research period in Linköping University.

The present certification is issued in Linköping, 18<sup>th</sup> of April 2017.

  
Dr. **Heriberto Rodríguez-Martínez**

Professor of Reproductive Biology, Department of Clinical and Experimental Medicine, BKH/OG, Faculty of Medicine & Health Sciences, Campus HU/US, Linköping University, Lasarettsgatan 64, floor 12, SE 581 85, Linköping, Sweden.



---

LINKÖPING UNIVERSITY    Contact  
Org 202100-3096    +46 (0)13-28 6925 alt +46(0)10-1032284  
Vat SE202100309601    Heriberto.rodriguez-martinez@liu.se.se

Postal Address    Visiting Address  
Lab 1-Building, Campus US    Lab-1 building, Entrance 65  
SE-581 85 Linköping    Campus US





Nouzilly, 2017-05-03

**Pascal Mermillod, PhD, HDR**  
Head of team « Interactions Cellulaires et  
Fertilité »

Tél : +33 2 47 42 79 20  
GSM : +33 6 08 27 97 59  
Mail : [Pascal.Mermillod@tours.inra.fr](mailto:Pascal.Mermillod@tours.inra.fr)

Isabel Barranco Cascales has been working in my laboratory from January 14<sup>th</sup> to March 17<sup>th</sup> 2016. During her stay, she worked on endometrial and oviductal epithelial cells cultures and the interactions of these cells with spermatozoa in vitro. During her stay, Isabel was well integrated in the team, worked very efficiently and produced very interesting results that will be expanded to lead to a common publication.



**I.N.R.A. Centre de VAL DE LOIRE**  
Unité Mixte de Recherches  
INRA-CNRS-UNIVERSITÉ de TOURS - IFCE  
Physiologie de La Reproduction  
et des Comportements  
37380 NOUZILLY - France

Dr Pascal Mermillod

---

UMR085 Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France





*Departamento de Medicina y Cirugía Animal*  
*Facultad de Veterinaria*  
*Universidad de Murcia*





*El contrato-beca que me ha permitido realizar la presente Tesis fue otorgado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU12/5008). Los experimentos contemplados en la presente Tesis han sido financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad y fondos FEDER EU (AGL2012-39903; AGL2013-43328-P; AGL2015-69738-R), la Fundación Séneca (19892/GERM/15), FORMAS, Stockholm (221-2011-512), el Swedish Research Council VR, Stockholm (521-2011-6553), y por el Research Council in Southeast Sweden (FORSS, 37809/312971).*



*A mis padres.*

*A mi abuela.*

*A Rubén.*



# AGRADECIMIENTOS

## ACKNOWLEDGEMENTS

No existen palabras en el diccionario para dar las gracias a mi director de Tesis, el **Dr. Jordi Roca**. Sin duda ha sido, más que un director, un segundo padre. Gracias, por tanto. Gracias por haberme hecho crecer en este tiempo, tanto profesional como personalmente. Gracias por confiar en mí y “ponerme las pilas”. Es todo un privilegio haberte tenido como director.

Del mismo modo, quiero destacar la labor del **Dr. Heriberto Rodríguez-Martínez**, co-director de esta Tesis. Gracias por la amabilidad, disponibilidad y atención recibida. Ha sido todo un honor que hayas sido mi co-director.

Al **Dr. Emilio Martínez**, por liderar esta gran familia y por haberme permitido formar parte de ella. Un ejemplo de gran investigador y mejor persona.

A la **Dra. Inmaculada Parrilla**, por haberme prestado siempre la ayuda necesaria y por sus consejos. Gracias por estar siempre dispuesta a echarme una mano. Tu capacidad de trabajo es sin duda un ejemplo para mí.

A la **Dra. Asta Tvarijonaviciute**, por ser una excelente investigadora, pero sobre todo una extraordinaria persona. Gracias por tu infinita paciencia y recibirme cada día con una sonrisa. Gracias por haberme permitido trabajar contigo.

A la **Dra. Cristina Cuello**, por darme la seguridad de que siempre estás ahí, capaz de resolver cualquier problema. Gracias por tu confianza y por las palabras necesarias en el momento adecuado.

A las **Dras. Xiomara Lucas, María Antonia Gil y Carolina Maside**, por todos sus consejos, su apoyo y sobre todo por su amistad. Gracias por hacer que la hora de la comida sea uno de los momentos más esperados del día.

A **Cristina Pérez**, mi compañera de “risas y fatigas”. Gracias simplemente por ser TÚ. Mi compañera, mi amiga, mi hermana. Porque somos capaces de hablar con solo una mirada. Gracias por tu generosidad, por tu apoyo incondicional, por estar siempre ahí, por haberme hecho que todo fuera mucho más fácil. Sin ti nada habría sido igual.

A “**las niñas**”, **Carmen Ródenas, Cristina Martínez y Alicia Nohalez**, compañeras y, sobre todo, amigas. Nada de esto habría sido posible sin vosotras. Ha sido una suerte para mí compartir con vosotras estos años. Gracias por como sois, por sufrir mis penas y alegrías, por todos los momentos vividos dentro y fuera del departamento. Y los que nos quedan.

A **Lola Ortega**, por poder contar contigo ante cualquier duda y problema. A **Diego Vilela**, por haber sido como un hermano mayor. A **Junwei Li**, por estar siempre disponible a ayudarme, por tu amabilidad y sonrisa. A **Lorena Padilla**, por convertirte en tan poco tiempo en una niña más, sin duda has sido una gran ‘adquisición’ de este Departamento. A los chicos del departamento, **Moisés, Miquel y Borja**, por su amabilidad y predisposición siempre que ha sido necesaria.

Al laboratorio de **Patología clínica**, y muy especialmente al **Dr. JJ Cerón**, gracias por ofrecerme tu ayuda cada vez que la he precisado.

A “los de Suecia”, **Alejandro Vicente-Carrillo, Manuel Alvarez y Marie Ruber**, gracias por la ayuda prestada, pero sobre todo por haber hecho que mi estancia en Linköping fuera una de las mejores experiencias de mi vida.

A la empresa **AIM Ibérica**, y muy especialmente a **María José Martínez**, amiga y compañera, por tu inestimable ayuda desde el inicio de esta aventura. También querría agradecer a **Alfonso, Manuel, Paco, Sergio y José Ramón**, por permitirme disponer de los animales necesarios para la elaboración de esta Tesis y por su extraordinaria predisposición a ofrecerme su ayuda.

He de agradecer profundamente al **Ministerio de Educación, Cultura y Deporte**, por proporcionarme el soporte económico durante estos cuatro años, sin el cual no hubiese podido realizar este trabajo.

A mis amigas, **María, Maleles, Noelia, Lourdes, Marta, Aída, Paloma y Arancha**, que a pesar de la distancia y las ausencias siguen mostrándome su apoyo y amistad como el primer día. Gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos.

A **mi familia**, sois el pilar de mi vida. Gracias por ser como sois. Sin duda, todo os lo debo a vosotros.

A **mi familia política**, por poder contar con vosotros siempre que lo he necesitado. Por saber escucharme y por -sin ellos saberlo- haberme ayudado.

A mis "**hermanas**", simplemente gracias por estar ahí, por ser como sois, por alegraros de cada uno de mis logros, por hacerme sentir que no sois dos sino tres.

A mi **abuela y a mi tata**, gracias por creer en mí, por darme siempre la confianza que necesitaba.

A **mis padres**, porque todo lo que soy os lo debo a vosotros. Todo lo que haga es vuestro. Gracias por darme esa confianza y tranquilidad que solo vosotros sois capaces de hacerme sentir. Gracias por darme la vida y permitirme llegar hasta aquí.

Por último, quiero dar las gracias a **Rubén**, mi amigo, mi confidente, mi fuerza, mi todo. Por soportarme y apoyarme a diario. Gracias por convertir lo difícil en sencillo. Gracias por ser como eres y apoyarme en cada una de las decisiones de mi vida. Espero poder seguir compartiendo todos mis logros contigo. Eres y serás mi mayor motivo para seguir adelante.

A **Dios**, por todo.





# INDICE

## INDEX

<b>Introducción</b>	3
<i>Introduction</i>	7
<b>Resumen</b>	13
<i>Summary</i>	29
<b>Referencias</b>	45
<i>References</i>	45
<b>Artículos</b>	49
<i>Papers</i>	49
<b>Artículo 1</b> <i>Paper 1</i>	55
<b>Artículo 2</b> <i>Paper 2</i>	59
<b>Artículo 3</b> <i>Paper 3</i>	63
<b>Artículo 4</b> <i>Paper 4</i>	67
<b>Artículo 5</b> <i>Paper 5</i>	71
<b>Abreviaturas</b>	75
<i>Abbreviations</i>	77
<b>Apéndice gráfico</b>	80
<i>Graphic appendix</i>	80



# **INTRODUCCIÓN**

## **INTRODUCTION**





**INTRODUCCIÓN** La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva mundialmente empleada en la industria porcina, desempeñando un papel esencial en la difusión de la mejora genética y en el aumento de la productividad. El continuo progreso científico ha permitido desarrollar nuevos procedimientos de IA que emplean un menor número de espermatozoides por dosis sin afectar a los resultados reproductivos (Roca y cols., 2016). Este avance lleva consigo una mayor difusión de verracos con un alto valor genético, una reducción en el número de verracos alojados en los centros de IA y un incremento de la proporción de cerdas inseminadas por verraco. Todo ello implica un incremento del número de dosis de IA por verraco y año, aumentando la repercusión reproductiva y económica que tienen los verracos incluidos en los programas de IA. Para que este sistema sea efectivo es necesario que los verracos empleados en estos programas sean fértiles. Para ello, los verracos que se incluyen en los mismos son seleccionados en base a una variedad de parámetros seminales, tales como volumen del eyaculado y la concentración, motilidad y morfología espermática, ya que se ha demostrado que tales variables están relacionadas con parámetros de fertilidad (Flowers, 2009; Broekhuijse y cols., 2011). Si bien estas pruebas nos permiten excluir a los verracos infértiles de los programas de IA (Flowers, 2009), no permiten identificar a los reproductores sub-fértiles (Tardif y cols., 1999) que constituyen entre el 5 y el 7% en los centros de IA porcina (Roca y cols., 2015). La inclusión de estos verracos sub-fértiles en los programas de IA trae como consecuencia importantes mermas reproductivas, y con ello, pérdidas económicas, tanto para las granjas de producción como también para los centros de IA. Por lo tanto, identificar verracos sub-fértiles antes de que sean incluidos en los programas de IA es uno de los objetivos prioritarios del sector. En un trabajo de revisión realizado por Roca y cols. (2015), se plantean dos abordajes para la identificación de estos verracos con menor eficiencia reproductiva: sus espermatozoides y su **plasma seminal (PS)**. La presente Tesis Doctoral pretende abordar esta problemática centrándose en el PS.

El PS es un fluido de compleja composición, constituido por la mezcla de secreciones procedentes del epidídimo, testículo y principalmente de las glándulas sexuales accesorias, que acompaña a los espermatozoides durante la eyaculación (Rodríguez-Martínez y cols., 2011). Durante años, las funciones del PS han estado asociadas exclusivamente a la nutrición, protección y transporte de los espermatozoides eyaculados (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Sin embargo, en la actualidad estas funciones del PS están siendo revisadas y conocemos que algunos de sus componentes influyen activamente en la funcionalidad espermática y otros interactúan con el tracto genital femenino, condicionando el proceso de fertilización e implantación embrionaria (Rodríguez-

Martínez y cols., 2009; Caballero y cols., 2012; Bromfield, 2016). En porcino, se han demostrado diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición del PS entre verracos, eyaculados, e incluso entre las fracciones del eyaculado (Thurston y cols., 2001; Strzezek y cols., 2005; Rodríguez-Martínez y cols., 2011). Tales diferencias en la composición del PS, más cuantitativas que cualitativas, podrían contribuir a explicar por qué algunos verracos, cuyos eyaculados son por número y calidad de los espermatozoides aptos para la IA, ofrecen resultados de fertilidad inferiores a los esperados y por qué los espermatozoides procedentes de determinadas fracciones/porciones de un mismo eyaculado soportan peor los procedimientos biotecnológicos, como la criopreservación y la separación entre espermatozoides con cromosomas X o Y (Saravia y cols., 2009; Alkmin y cols., 2014).

Actualmente, la repercusión que el PS pueda tener sobre el espermatozoide ha adquirido una mayor relevancia en la especie porcina debido a los cambios que se están produciendo en los protocolos de recogida de los eyaculados en los centros de IA. El método tradicional de recolección, que permite la recogida selectiva de las fracciones, y con ello, obtener exclusivamente la fracción rica en espermatozoides (**FR**) (Althouse, 2007), está siendo reemplazado por procedimientos de recolección seminal semi-automáticos, como el Collectis®. Estos sistemas permiten una recolección más higiénica del eyaculado y el ahorro en personal, pero obligatoriamente conllevan la necesidad de tener que recoger y procesar todo el eyaculado (Barrabes y cols., 2008). La diferencia entre recoger todo el eyaculado en lugar de sólo la FR radica principalmente en que la proporción de PS y, consecuentemente su repercusión sobre los espermatozoides, es mucho mayor. Este hecho se ha evidenciado en la criopreservación espermática y en la separación de los espermatozoides X e Y, que ofrecen peores resultados cuando los espermatozoides proceden del eyaculado completo en lugar de la FR (Alkmin y cols., 2014; 2016).

Como ya hemos comentado anteriormente, el PS de porcino, de manera similar al de otras especies ganaderas, tiene una composición cualitativamente compleja, caracterizada por tener un gran contenido de agua, iones, azúcares, ácidos orgánicos, hormonas, y, principalmente, una gran variedad de aminoácidos y proteínas (Rodríguez-Martínez y cols., 2011; Pérez-Patiño y cols., 2016). Algunos de los componentes del PS tienen propiedades antioxidantes, entre los que se incluirían tanto enzimas, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, como componentes de naturaleza no enzimática, como el L-ascorbato, el piruvato, la taurina o el glutatión, entre otros (Strzezek y cols., 1999). Los espermatozoides de mamífero son sensibles al

estrés oxidativo por su limitado mecanismo de defensa antioxidante citoplasmático. Los espermatozoides de porcino son, a causa de la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana, especialmente sensibles al estrés oxidativo (Radomil y cols., 2011). En este contexto, los componentes del PS con capacidad antioxidante desempeñan un importante rol protegiendo a los espermatozoides frente al estrés oxidativo (Brouwers y cols., 2005; Bathgate, 2011). Apenas existen estudios que evalúen la concentración y actividad de estos antioxidantes en el PS porcino. No obstante, son numerosos los estudios que, basados en experimentos empíricos, demuestran la efectividad para proteger a los espermatozoides de alguno de los arriba mencionados antioxidantes cuando son añadidos a los diluyentes seminales. En concreto, Roca y cols. (2005) demostraron que la adición de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, ambas con propiedades antioxidantes, al medio de congelación (**MC**) mejoraba la calidad espermática a la descongelación e incluso la capacidad de los espermatozoides para generar embriones *in vitro*. El rol protector de los antioxidantes, concretamente la vitamina E y el glutatión, frente a la peroxidación lipídica de los espermatozoides de porcino, también fue demostrado por Brzezińska-Ślebodzińska y cols. (1995). Más recientemente, Giaretta y cols. (2015) evidenciaron que la suplementación del MC y descongelación espermática con componentes antioxidantes de naturaleza no enzimática, como el glutatión y ácido ascórbico, mejoraba la criotolerancia del espermatozoide porcino. Peña y cols. (2003) evaluaron el efecto de la suplementación del MC con antioxidantes en muestras de semen procedentes de los primeros 10 ml de la FR y del resto del eyaculado porcino, demostrando que para ambas fracciones la suplementación con antioxidantes mejoraba la calidad espermática a la descongelación, siendo este efecto más evidente en los espermatozoides procedentes del resto del eyaculado. Esta diferente respuesta a la suplementación con antioxidantes sugiere posibles diferencias entre fracciones/porciones en la capacidad antioxidante del propio PS de porcino. Recientemente se han determinado componentes intrínsecos en el PS de porcino con propiedades antioxidantes (Zakošek Pipan y cols., 2014; Dziekońska y cols., 2014; Zura Zaja y cols., 2016). Sin embargo, son limitados los estudios que relacionen la mayor o menor actividad y/o concentración de estos componentes antioxidantes con parámetros de fertilidad *in vivo* en porcino.

Basándonos en estos antecedentes, la presente Tesis Doctoral se ha propuesto como objetivo estudiar algunos de los componentes del PS de porcino con propiedades antioxidantes, centrándose principalmente en la repercusión que dichos componentes podrían tener tanto sobre la calidad y funcionalidad espermática como sobre la capacidad fecundante de las dosis seminales utilizadas en programas de IA. En concreto se ha estudiado la capacidad antioxidante total (**TAC**),

las enzimas paraoxonasa tipo 1 (**PON-1**) y glutatión peroxidasa 5 (**GPX5**), y la melatonina (**MLT**). La Tesis Doctoral se presenta por compendio de publicaciones, y está estructurada en 5 artículos científicos, todos ellos publicados en revistas internacionales indexadas en la base de datos de Journal Citation Reports. Brevemente, el **primer artículo (Scientific Reports 2015, 5:18538)** recoge experimentos centrados en evaluar la TAC del PS porcino y su relación con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y con la fertilidad. Ya que la determinación de la TAC no recoge la actividad de los componentes antioxidantes enzimáticos (Fraga y cols., 2014), la mayoría de los siguientes artículos se han centrado en evaluar algunos de las más significativas enzimas con propiedades antioxidantes. Así, en el **segundo artículo (Molecular Reproduction & Development 2015, 82:58-65)** se identifica y cuantifica, por primera vez en el PS de porcino, la concentración y actividad de una enzima con probadas propiedades antioxidantes, la PON-1. Conocedores de la relación demostrada entre la actividad de la PON-1 en el PS humano con la fertilidad (Verit y cols., 2009), en el **tercer artículo (Andrology 2015, 3:315-320)** se evalúa la posible relación entre la actividad de PON-1 en el PS de porcino con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y de fertilidad. Posteriormente, y basándonos en los resultados preliminares obtenidos por Novak y cols. (2010), quienes sugirieron que la GPX5 del PS porcino estaría relacionada positivamente con la tasa de gestación, se lleva a cabo un **cuarto artículo (PLoS One 2016, 11:e0162958)**, cuyos experimentos tienen por finalidad cuantificar la concentración de GPX5 en el PS de porcino, evaluando su relación con parámetros de calidad espermática y la fertilidad después de la IA. Finalmente, el **quinto artículo (Journal of Animal Science 2017, 95:1660–1668)** se centra en la MLT, una molécula a la que se le han atribuido propiedades antioxidantes (Bonnetfont-Rousselot y cols., 2010; Karaaslan y Suzen, 2015) y que está presente en el PS porcino (Gonzalez-Arto y cols., 2016). Los experimentos contemplados en dicho artículo se centran en cuantificar la concentración de MLT en el PS de porcino y su posible variación estacional, así como en evaluar su relación con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y con la fertilidad.



**INTRODUCTION** Artificial insemination (AI) is not just the reproductive technology most widely used by the pig industry worldwide, but also an indispensable tool for spreading genetic progress and the improvement of productivity. Scientific progress has enabled the development of new AI procedures using lower sperm number/AI dose without compromising fertility outcomes (Roca *et al.*, 2016). This involves a relevant increase in the genetic spreading of merit boars, a decrease in the number of boars housed in the AI centers and an increase in the ratio of sows inseminated per boar. At the same time, it implies higher numbers of AI doses produced per single breeding boar per year, thus increasing the reproductive and economic impact of boars included in the AI-programs. In order for this system to function properly, it is crucial that the boars used are fertile. The boars included in AI-programs are selected via a standardized spermogram, including ejaculate volume, sperm concentration, and the percentage of motile and morphologically normal sperm, owing to the relation of some of these variables to fertility parameters (Flowers, 2009; Broekhuijse *et al.*, 2011). Although these semen parameters are powerful enough to identify boars with substantial fertility deficiencies (Flowers, 2009), they are unable to identify sub-fertile boars (Tardif *et al.*, 1999) whose proportion in AI centers ranges from 5 to 7% (Roca *et al.*, 2015). The inclusion of these sub-fertile boars in AI programs involves considerable *economic losses* at farm level, as well as for the AI centers. Therefore, identifying sub-fertile boars before that they are included in AI programs is a priority for AI centers. In this sense, Roca *et al.* (2015) proposed two approaches for the identification and exclusion of boars with reduced reproductive efficiency: sperm and **seminal plasma (SP)** roles. This PhD Thesis aims to address this issue by focusing on the SP.

The SP is a complex fluid, mainly composed by secretions of the testis, the epididymis and the accessory sex glands, that accompanies spermatozoa during and after ejaculation (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Traditionally, the SP functions have been associated exclusively with the nutrition, protection and transport of the ejaculated sperm (Mann and Lutwak-Mann, 1981). However, these SP-functions are nowadays being revisited for the influence of some SP-components on to sperm functionality and their signaling to the female genital tract, conditioning fertilization and the subsequent embryo development (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Caballero *et al.*, 2012; Bromfield, 2016). In pigs, qualitative and quantitative differences in SP composition have been demonstrated among boars, ejaculates within boar, and even among ejaculate fractions within an ejaculate (Thurston *et al.*, 2001; Strzezek *et al.*, 2005; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011). Such differences in SP composition, being more quantitative than qualitative, may explain why

some boars, showing good semen parameters, offer fertility outcomes lower than expected and why sperm from certain fractions / portions of ejaculate support less handling procedures, such as cryopreservation or sex-sorting (Saravia *et al.*, 2009; Alkmin *et al.*, 2014).

Nowadays, the putative influence that SP can exert on spermatozoa has become more relevant in pigs, due to the changes in the ejaculate collection systems in AI centers. The traditional collection method, which allows selective sampling of particular fractions as the sperm-rich fraction (SRF) (Althouse, 2007), is being replaced by semi-automatic collection procedures such as Collectis®. Although these semi-automatic systems allow more hygienic ejaculate collection and lower cost-labor, it forces the collection of the entire ejaculate (Barrabes *et al.*, 2008). The main difference between collecting the entire ejaculate instead of the SRF is a higher proportion of SP, and therefore, in the putative influence of SP on spermatozoa. This has been evidenced in biotechnological procedures, such as cryopreservation and sex-sorting, which offer worse results when the spermatozoa come from the entire ejaculate instead of the SRF (Alkmin *et al.*, 2014; 2016).

As previously mentioned, the biochemical composition of porcine SP, as in other livestock species, is qualitatively complex, characterized by high content of water, ions, sugars, organic acids, hormones, and, mainly, a large variety of amino acids and proteins (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011; Perez-Patiño *et al.*, 2016). Some of these SP-components possess antioxidant properties, including enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, and non-enzymatic components such as L-ascorbate, pyruvate, taurine or glutathione, among others (Strzezek *et al.*, 1999). Boar spermatozoa are particularly susceptible to oxidative stress due to the limited antioxidant defense mechanism in their cytoplasm and to the large proportion of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane (Radomil *et al.*, 2011). Therefore, SP-components with antioxidant properties play a pivotal role in protecting sperm against oxidative stress (Brouwers *et al.*, 2005; Bathgate, 2011). Few studies have assessed the concentration and activity of these antioxidants in boar SP. Yet, empirical studies have reported protective effects on sperm survival by addition of some of the above-mentioned antioxidants. Specifically, Roca *et al.* (2005) demonstrated that the addition of two reactive oxygen species-scavenging enzymes, catalase and superoxide dismutase, to freezing extender (FE) improved post-thaw sperm quality and even the ability of frozen-thawed spermatozoa to produce embryos *in vitro*. The protective role of antioxidants, specifically vitamin E and glutathione, against lipid peroxidation in boar spermatozoa, was also demonstrated by Brzezińska-Ślebodzińska *et al.* (1995). Recently, Giaretta

*et al.* (2015) showed that supplementation of FE and thawing media with the non-enzymatic antioxidants glutathione and ascorbic acid improved boar sperm cryotolerance. Peña *et al.* (2003) evaluated the effect of antioxidant supplementation during cooling on spermatozoa from the first 10 mL of FR and the rest of ejaculate, demonstrating the positive effects of these antioxidants on post-thaw boar sperm quality in each ejaculate portion, being the effect more evident in the spermatozoa present in the rest of the ejaculate. This different response to antioxidant supplementation suggests possible differences in boar SP antioxidant capacity among ejaculate fractions / portions. Recently, some intrinsic boar SP-components with antioxidant properties have been studied (Zakošek Pipan *et al.*, 2014; Dziekońska *et al.*, 2014; Zura Zaja *et al.*, 2016). However, there are few experiments that evaluated the potential relationship among the activity and/or concentration of antioxidant SP-components with *in vivo* fertility parameters in boars.

With this background, this PhD thesis aims to study some of boar SP-components with antioxidant properties, focusing mainly on the potential influence that these components could have in both sperm quality and functionality as well as in fertilizing capacity of AI-doses used in AI-programs. Specifically, the total antioxidant capacity (TAC), the enzymes paraoxonase type 1 (PON-1) and glutathione peroxidase 5 (GPX5), and the melatonin (MLT) have been studied. The PhD thesis is structured as a cover for 5 scientific papers, all published in international journals indexed in the database of Journal Citation Reports. Briefly, the **first paper (Scientific Reports 2015, 5: 18538)** evaluated boar SP-TAC and its relationship with sperm quality and functionality and fertility parameters. Since the SP-TAC measurement does not include the activity of enzymatic components (Fraga *et al.*, 2014), most of the following papers focus on evaluating some of the most significant enzymes with antioxidant properties. Thus, in the **second paper (Molecular Reproduction & Development 2015, 82: 58-65)** the PON-1 enzyme, with proven antioxidant properties was identified and quantified (concentration and activity) for the first time in boar SP. Based on the relationship between human SP-PON-1 activity and fertility as demonstrated by Verit *et al.* (2009), the **third paper (Andrology 2015, 3: 315-320)** marks the putative relationship among SP-PON-1 activity with sperm quality, functionality and fertility. Subsequently, and based on the preliminary results obtained by Novak *et al.* (2010), who suggested that boar SP-GPX5 would be positively related to farrowing rate, a **fourth paper (PLoS One 2016, 11: e0162958)** described experiments aiming to quantify GPX5 concentration in the SP, assessing its relationship with sperm quality and fertility post-AI. Finally, the **fifth paper (Journal of Animal Science 2017, 95: 1660-1668)** focused on MLT, a molecule with antioxidant properties (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2010; Karaaslan and Suzen, 2015) present in boar SP (Gonzalez-Arto *et al.*, 2016). The experiments of

this article aimed to quantify seasonal variation of MLT concentration in boar SP, as well as to evaluate its potential relationship with sperm quality and functionality and fertility parameters.

**RESUMEN**  
**SUMMARY**





**RESUMEN** El objetivo principal de la Tesis Doctoral fue **determinar componentes con propiedades antioxidantes en el plasma seminal (PS) de porcino y evaluar su valor predictivo para la calidad y funcionalidad espermática y para la fertilidad en verracos incluidos en programas de inseminación artificial (IA).**

Para alcanzar este propósito se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- OBJETIVO 1 | Analizar la capacidad antioxidante total (**TAC**) del PS porcino, evaluando su relación con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y de la fertilidad de eyaculados procedentes de verracos incluidos en programas de IA (**Artículo 1**).
- OBJETIVO 2 | Identificar y caracterizar la presencia de la enzima paraoxonasa-1 (**PON-1**) en PS y evaluar la relación entre la actividad de PON-1 en PS con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y de fertilidad de eyaculados procedentes de verracos incluidos en programas de IA (**Artículos 2 y 3**).
- OBJETIVO 3 | Determinar la importancia de la enzima glutatión peroxidasa 5 (**GPX5**) en el PS porcino, identificando sus lugares de expresión en los órganos genitales del verraco y evaluar la relación entre su concentración en PS con parámetros de calidad espermática y de fertilidad de eyaculados procedentes de verracos incluidos en programas de IA (**Artículo 4**).
- OBJETIVO 4 | Examinar la concentración de melatonina (**MLT**) en el PS porcino y su posible variación estacional, así como evaluar si está relacionada con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y de fertilidad de eyaculados procedentes de verracos incluidos en programas de IA (**Artículo 5**).

A continuación, se detallan los **materiales y métodos** empleados para desarrollar los correspondientes experimentos:

### **Reactivos químicos y medios**

Todos los reactivos químicos empleados en los experimentos fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), excepto aquellos en los que se indique otra fuente. Los medios utilizados fueron preparados en una campana de flujo laminar (MicroH; Telstar, Terrassa, España) bajo condiciones de esterilidad, usando agua bidestilada y purificada procedente de un sistema Mili-Q (18 M $\Omega$  cm; Millipore Co., Billerica, MA, EEUU). Previa utilización de los mismos, se comprobó su pH (GLP-22, Crison; Barcelona, España) y osmolaridad (VAPRO, WESCOR, mod 30M Plus Advanced Instruments Inc.; MA, EEUU).

### **Animales y muestras**

Todos los experimentos llevados a cabo se realizaron de acuerdo a la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y fueron aprobados por el Comité Bioético de la Universidad de Murcia (Código 639/2012).

Todos los eyaculados, fluido epididimal y muestras de tejidos utilizados en los correspondientes estudios procedían de verracos sanos, sexualmente maduros, con edades comprendidas entre los 1,5 y 3 años, de diferentes razas o cruces, utilizados de manera rutinaria para la elaboración de dosis seminales de IA comerciales (AIM Ibérica [Topigs Norsvin España, Madrid, España]). Los verracos estaban alojados en parques individuales, bajo condiciones controladas de luz (16 h día) y temperatura (15-25 °C). Los verracos tenían libre acceso al agua y su dieta estaba basada en pienso comercial formulado de acuerdo a los requerimientos de verracos adultos sometidos a un régimen de manejo propio de un centro de IA. Todos los eyaculados empleados en los experimentos cumplían los estándares de cantidad y calidad espermática necesarios para la elaboración de dosis de IA, esto es  $\geq 200 \times 10^6$  espermatozoides/ml,  $\geq 70\%$  espermatozoides móviles y  $\geq 75\%$  de espermatozoides morfológicamente normales.



Las cerdas inseminadas eran multíparas (1-7 partos) de razas Landrace y Large White, alojadas en diferentes granjas de España. Las cerdas fueron inseminadas cervicalmente (2-3 veces por estro) utilizando dosis de IA ( $2.500 \times 10^6$  espermatozoides en 80 ml) almacenadas a 17 °C durante 24-72 h.

### **Obtención y almacenamiento del plasma seminal**

Las muestras de PS fueron obtenidas mediante doble centrifugación a 1.500 xg durante 10 min (Rotofix32A, Hettich Zentrifugen, Reino Unido) inmediatamente después de la obtención del eyaculado. Tras la segunda centrifugación, el sobrenadante fue recolectado, almacenado en criotubos y enviado en cajas isotérmicas (15-17 °C) al laboratorio de andrología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia. Todas las muestras de PS llegaron en el plazo de 2-4 h tras su obtención y una vez en el laboratorio fueron almacenadas a -80 °C (Ultra Low Freezer, Haier Inc., Qingdao, China). Las muestras de PS fueron descongeladas a temperatura ambiente en el momento de realizar los correspondientes análisis.

### **Análisis de la calidad y funcionalidad espermática**

Los parámetros de calidad y funcionalidad espermática, a excepción de la motilidad, fueron evaluados mediante citometría de flujo usando el BD FACS Canto II (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU).

La **motilidad espermática** fue objetivamente evaluada mediante un sistema de análisis espermático computarizado (ISASV1® CASA, Proiser R+D S.L., Paterna, España) (**Artículos 1, 3-5**). Los parámetros de motilidad registrados fueron el porcentaje total de espermatozoides móviles (velocidad de trayectoria media  $\geq 20 \mu\text{m/s}$ ) y el porcentaje de espermatozoides con movimiento rápido y progresivo (velocidad rectilínea  $\geq 40 \mu\text{m/s}$ ).

La **viabilidad espermática**, expresada como el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática y acrosomal intactas (**Artículos 1, 3-5**), fue evaluada utilizando un protocolo de triple tinción fluorescente que incluía ioduro de propidio (**IP**, Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holanda), un conjugado de fluoresceína con aglutinina de maní (**PNA-FITC**) y Hoechst 33342 (**H-42**). Los espermatozoides viables fueron aquellos que exhibieron las membranas

plasmática y acrosomal intactas (H-42 positivo, IP negativo y PNA-FITC negativo) y fueron expresados como porcentaje.

La **producción intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** en espermatozoides viables fue evaluada usando los fluorocromos 5-(y-6) clorometil-2',7' diacetato diclorodihidrofluoresceína de éster de acetilo (**CM-H<sub>2</sub>DCFDA**, Molecular Probes), H-42 y PI, y siguiendo el protocolo descrito por Guthrie y Welch (2006) (**Artículos 1, 3 y 5**). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides viables (H-42 positivo y IP negativo) que producían H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>DCFDA positivo).

La **peroxidación lipídica** en espermatozoides viables fue evaluada usando los fluorocromos C<sub>11</sub> BODIPY<sup>581/591</sup> (**BODIPY**, Molecular Probes), H-42 y PI, y siguiendo una modificación del protocolo descrito por Silva y Gadella (2006) (**Artículos 1 y 5**). Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia por 10<sup>3</sup> espermatozoides viables (H-42 positivo y IP negativo) (**Artículo 1**) o como el porcentaje de espermatozoides viables BODIPY positivos (**Artículo 5**).

La **producción mitocondrial de O<sub>2</sub><sup>-</sup>** en espermatozoides viables fue evaluada usando los fluorocromos MitoSOX Red (**MSR**, Molecular Probes), H-42 y SYTOX Green (Molecular Probes), y siguiendo una modificación del protocolo descrito por Koppers y cols. (2008) (**Artículo 5**). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides viables (H-42 positivo y SYTOX Green negativo) MSR positivos.

La **producción total de O<sub>2</sub><sup>-</sup>** en espermatozoides viables fue evaluada usando los fluorocromos Dihidroetidio (**DHE**, Molecular Probes), H-42 y SYTOX Green (Molecular Probes), siguiendo una modificación del protocolo descrito por Koppers y cols. (2008) (**Artículo 5**). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de espermatozoides viables (H-42 positivo y SYTOX Green negativo) DHE positivos.

### **Criopreservación espermática (Artículo 1)**

Las muestras de semen fueron centrifugadas (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Alemania) (2.400 xg durante 3 min a 17 °C), y los espermatozoides presentes en el pellet fueron criopreservados según el protocolo descrito por Alkmin y cols., 2014. Brevemente, el pellet fue diluido con medio de congelación (**MC**) hasta una concentración de 1.5 x10<sup>9</sup> espermatozoides/ml. Después de su enfriamiento hasta 5 °C durante 150 min, el pellet fue re-diluido en MC-glicerol-

equex hasta alcanzar una concentración de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml. Posteriormente, los espermatozoides fueron envasados en pajuelas de cloruro de polivinilo (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) de 0,5 ml y congelados mediante un biocongelador (IceCube 1810, Minitüb, Germany). Las pajuelas fueron almacenadas en tanques de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación, la cual se realizó sumergiendo éstas en un baño de agua a 37 °C durante 20 segundos.

### **Determinación de la TAC (Artículo 1)**

La TAC de las muestras de PS fue determinada siguiendo el protocolo desarrollado por Erel (2004) y validado para PS en nuestro laboratorio. Este método está basado en la decoloración del 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) por antioxidantes no enzimáticos conforme a su concentración y capacidad antioxidante. El cambio de color es medido como un cambio en la absorbancia de la luz a 660 nm. Para esta determinación, se usó un analizador automatizado (AU400, Olympus, Minneapolis, EEUU) y el ensayo fue calibrado con el ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (**Trolox**). La TAC de cada una de las muestras de PS se expresó en equivalente mM de Trolox por litro.

### **Determinación de la actividad de enzimática de la PON-1 (Artículos 2 y 3)**

La actividad enzimática de PON-1 en muestras de PS fue determinada midiendo la hidrólisis del p-nitrofenil acetato a p-nitrofenol en un analizador automatizado (AU400, Olympus), adaptando para PS el protocolo previamente descrito por Tvarijonavičiute y cols. (2012). El p-nitrofenil acetato es el sustrato recomendado para medir la actividad enzimática de PON-1 en fluidos corporales (Cerón y cols., 2014). Antes de su determinación, las muestras de PS fueron tratadas con acetazolamida (0,5 mM) y di-isopropilfluorofosfato (0,5 mM) con el objetivo de asegurar que no había otras enzimas, distintas a PON-1, que pudieran hidrolizar el p-nitrofenil acetato. Esta técnica tuvo un coeficiente de variación menor del 10%, intra- e inter-ensayo, y una alta linealidad en las diluciones seriadas con un límite de detección de 0,01 UI/ml. La actividad se expresó en UI/ml.

### **Determinación de la concentración de la PON-1 (Artículo 2)**

La concentración de PON-1 fue determinada en las muestras de PS usando un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (**ELISA**) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Aviscera Bioscience Inc. Santa Clara, California, EEUU). Esta técnica utiliza una placa 96 pocillos recubierta con anticuerpos monoclonales específicos para PON-1. Brevemente, los estándares y las muestras fueron pipeteados en los pocillos. A continuación, se añadió el anticuerpo específico para PON-1 y, posteriormente, anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Finalmente, se añadió el sustrato (tetrametilbenzidina [**TMB**]) y el cambio de color dependió de la cantidad de PON-1 unida, midiéndolo a 450/540 nm usando un lector de placas (Sunrise, Tecan Austria, GmbH, Grödig, Austria). Los resultados fueron expresados en ng/ml.

### **Determinación de la concentración de colesterol (Artículo 2)**

La concentración de colesterol en las muestras de PS se cuantificó utilizando un analizador automatizado (AU2700, Olympus) siguiendo las instrucciones del fabricante (CHOLESTEROL OSR6116, Beckman Coulter, Brea, CA, EEUU). En este procedimiento, los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima esterasa de colesterol. El colesterol libre que se produce es oxidado por la oxidasa de colesterol a colestén-3-ona con la producción simultánea de peróxido de hidrógeno, que oxidativamente se acopla con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa para producir un cromóforo. El color rojo de la quinoneimina formada se midió espectrofotométricamente a 540/600 nm como un aumento en absorbancia. La concentración se expresó en mg/ml.

### **Determinación de la concentración de la GPX5 (Artículo 4)**

La concentración de GPX5 fue determinada en PS usando un ELISA, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Mybiosource, San Diego, California, EEUU). Esta prueba utiliza una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos monoclonales específicos para GPX5 de porcino. Brevemente, los estándares y las muestras se pipetearon en los pocillos y cualquier GPX5 presente se unió al anticuerpo de la placa. A continuación, se añadió un anticuerpo conjugado con biotina específico para GPX5 y, posteriormente, estreptavidina conjugada con

peroxidasa de rábano. Finalmente, se añadió el sustrato y el cambio de color dependió de la cantidad de GPX5 unida, midiéndola a 450/590 nm usando un lector de placas (PowerWave XS; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EEUU). La concentración se expresó en ng/ml.

#### **Determinación de la concentración de MLT (Artículo 5)**

La concentración de MLT fue determinada en las muestras de PS usando un ELISA siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Direct saliva melatonin ELISA kit; Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Suiza). Este ensayo utiliza una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpos específicos frente a la MLT. Brevemente, los estándares y las muestras se pipetearon en los pocillos donde cualquier MLT presente se une al anticuerpo de la placa. A continuación, se añadió MLT biotinilada y, posteriormente, el marcador de enzima (estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano). Finalmente, se añadió el sustrato de TMB y  $\text{SO}_4\text{H}_2$  para formar un producto de color cuya concentración era inversamente proporcional a la cantidad de MLT presente en la muestra. La concentración se cuantificó a 450 nm usando un lector de placas (TECAN Spectraflor plus; Tecan Schweiz AG, Männedorf, Suiza) y los resultados se expresaron en pg/ml.

#### **Análisis inmunohistoquímico (Artículo 4)**

Las secciones de las muestras de tejidos fueron desparafinadas e incubadas con un anticuerpo policlonal primario contra GPX5 (ab190733, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Después, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal conjugado con biotina (Dako, Stockholm, Suecia). La inmunotinción se realizó utilizando el kit VECTASTAIN Elite ABC y el sustrato ImmPACT DAB Peroxidasa (Vector Labs, Burlingame, EEUU). Las muestras fueron visualizadas usando un microscopio óptico (Olympus BX51, Olympus) equipado con contraste de fase y una cámara XC30 (Olympus), y el software CellSens Olympus (Olympus). Las muestras fueron evaluadas por tres observadores independientes para determinar los cambios en la distribución o la intensidad subjetiva entre los verracos explorados. Para el análisis se usó un sistema de clasificación simple (0: sin tinción, + - +++ diversos grados de intensidad).

## **Western Blot (WB) (Artículo 4)**

Las proteínas fueron extraídas de los tejidos usando el tampón RIPA. Tras una centrifugación, el sobrenadante se procesó para la cuantificación de proteínas y una cantidad conocida de proteína fue cargada en el gel. Para realizar el WB se utilizó un anticuerpo policlonal primario frente a GPX5 (ab190733, Abcam) siguiendo el protocolo descrito por Vicente-Carrillo y cols. (2016), con ligeras modificaciones.

## **Registro de fertilidad**

Los registros de fertilidad de los verracos, en términos de tasa de parto (número de cerdas que paren respecto al número de cerdas inseminadas), tamaño de camada (número total de lechones nacidos por camada) e índice de fertilidad (número de lechones nacidos por cada 100 cerdas inseminadas) fueron recogidos durante un período de 6 (**Artículos 3 y 5**) o 12 meses (**Artículos 1 y 4**). Al menos 100 cerdas fueron inseminadas por verraco.

## **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM España, Madrid). La normalidad de distribución de datos se comprobó con el test Kolmogorov-Smirnov. En aquellos casos de distribución anormal, se realizó una transformación arcoseno (datos expresados en porcentajes) o logarítmica (datos de recuento). Para el análisis de la mayoría de los datos se utilizaron análisis de varianza, de una o dos vías y modelos mixtos, utilizando el post-hoc de Bonferroni cuando fue necesaria. El coeficiente de correlación intra-clase fue usado para evaluar la fiabilidad de la variabilidad intra-verraco. El análisis de conglomerado jerárquico fue usado para la identificación de grupos. El coeficiente de correlación de Pearson fue calculado para evaluar la relación entre varias variables. Finalmente, el valor predictivo de la concentración de GPX5 en el PS sobre la fertilidad y prolificidad fue calculado mediante curvas **COR** (Característica Operativa del Receptor).

A continuación, se detallan los **diseños experimentales y resultados** de cada uno de los artículos que comprenden la Tesis Doctoral:

El **primer artículo (Scientific Reports 2015, 5:18538)** cumple con el **primer objetivo**, evaluando la TAC del PS porcino. Este estudio comprende 3 experimentos. El objetivo del primer experimento fue identificar las potenciales diferencias en la TAC del PS entre verracos, eyaculados dentro de un mismo verraco y entre las diferentes fracciones del eyaculado. Para ello, la TAC fue evaluada en muestras de PS de eyaculados completos (60 eyaculados [4 por verraco]) y de 3 fracciones del eyaculado (los primeros 10 ml de la fracción rica [**FR**], el resto de la FR y la post-FR) de 43 eyaculados (uno por verraco). Los resultados demostraron que la TAC del PS difería entre verracos ( $P < 0,001$ ) y, en menor grado, entre eyaculados dentro de un mismo verraco ( $P < 0,001$ ). Asimismo, también se observaron diferencias en la TAC del PS procedente de distintas fracciones del eyaculado ( $P < 0,001$ ), mostrando el PS de los primeros 10 ml de la FR y de la post-FR el más alto y más bajo valor, respectivamente. El objetivo del segundo experimento fue evaluar la potencial influencia de TAC del PS en la capacidad del espermatozoide a soportar la conservación, refrigerado a 17 °C (experimento 2a) o criopreservado (-196 °C, experimento 2b). Para el experimento 2a, un total de 90 eyaculados (uno por verraco) fueron diluidos ( $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y almacenados a 15-17 °C, evaluando los parámetros de calidad (motilidad [total y progresiva] y viabilidad espermática) y funcionalidad espermática (producción intracelular de  $H_2O_2$  y peroxidación lipídica) a las 24 y 72 h de almacenamiento. Una muestra de PS de cada uno de los eyaculados fue destinada para evaluar la TAC. Los eyaculados se clasificaron en 3 grupos en función de la TAC de su PS: alta, moderada y baja ( $P < 0,001$ ). Los parámetros de calidad y funcionalidad espermática evaluados no difirieron entre grupos. Sin embargo, los eyaculados con baja TAC mostraron un mayor descenso relativo en los parámetros de calidad espermática evaluados entre ambos tiempos ( $P < 0,05$ ). Para el experimento 2b, un total de 14 eyaculados (2 por verraco) fueron criopreservados en fracciones: los primeros 10 ml de la FR, el resto de la FR y el eyaculado completo (creado por una mezcla proporcional de las fracciones del eyaculado [compuesto principalmente por la post-FR]) siguiendo el protocolo descrito por Alkmin y cols. (2014). Muestras de PS de cada fracción y de los eyaculados completos fueron usados para evaluar la TAC. Los parámetros de calidad y funcionalidad espermática (descritos en el exp. 2a) fueron evaluados a los 30 y 150 min post-descongelación. Los parámetros de calidad espermática mostraron similares resultados entre los primeros 10 ml de la FR y el resto de la FR,

siendo éstos mejores ( $P < 0,01$ ) a los del eyaculado completo, independientemente del tiempo de evaluación. La producción intra-celular de  $H_2O_2$  y la peroxidación lipídica en espermatozoides viables a la descongelación fue mayor en el eyaculado completo ( $P < 0,01$ ) con respecto a los primeros 10 ml de la FR y el resto de la FR. Finalmente, el tercer experimento evaluó la posible relación entre la TAC del PS y los parámetros de fertilidad (en términos de tasa de parto, tamaño de la camada e índice de fertilidad). Para ello, se utilizaron un total de 18 verracos incluidos en programas de IA y se recogieron sus resultados reproductivos a lo largo de un año, con un número de cerdas inseminadas por verraco que osciló entre 107 y 801. La TAC fue evaluada en muestras de PS de 3 eyaculados de cada uno de los verracos (un eyaculado cada 4 meses recogidos durante el periodo de evaluación). Los resultados demostraron que la TAC del PS estaba positivamente correlacionada con el tamaño de camada ( $r = 0,54$ ,  $P < 0,05$ ) e índice de fertilidad ( $r = 0,52$ ,  $P < 0,05$ ). Los verracos fueron clasificados en 2 grupos en función de la TAC de su PS: alta o baja ( $P < 0,001$ ). Los verracos con alta TAC en su PS mostraron mejores parámetros de fertilidad, en términos de tasa de parto ( $P < 0,05$ ), tamaño de la camada ( $P < 0,01$ ) e índice de fertilidad ( $P < 0,01$ ) comparados con aquellos con baja TAC en su PS.

El **segundo artículo (Molecular Reproduction & Development 2015, 82:58-65)** desarrolla parte del **segundo objetivo**, identificando por primera vez en el eyaculado porcino la enzima PON. Para ello, la concentración y la actividad enzimática de PON-1 fueron evaluadas en 10 muestras de PS procedentes de 10 eyaculados (uno por verraco). Los resultados demostraron la presencia de PON-1 en el PS porcino, observando una correlación negativa entre su concentración y su actividad ( $r = -0,76$ ,  $P < 0,01$ ), estando esta última a su vez negativa y positivamente correlacionada con el volumen del eyaculado ( $r = -0,72$ ,  $P < 0,05$ ) y con la concentración espermática ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,05$ ), respectivamente. Dado que la unión de PON-1 a las lipoproteínas de alta densidad (**HDL-C**) es un requisito para que ésta pueda ejercer su actividad (James y Deakin, 2004) se evaluó la concentración de colesterol (que incluye HDL-C, lipoproteínas de baja densidad y lipoproteínas de muy baja densidad) en las mismas 10 muestras de PS. La concentración de colesterol en el PS estuvo correlacionada negativamente con la concentración de PON-1 ( $r = -0,71$ ,  $P < 0,05$ ) y positivamente con la actividad de PON-1 ( $r = 0,77$ ,  $P < 0,01$ ).

El **tercer artículo (Andrology 2015, 3:315-320)** completa el **segundo objetivo**, evaluando la relación entre la actividad de PON-1 en el PS con parámetros de calidad y funcionalidad espermática y de fertilidad. Para este estudio se plantearon 4 experimentos. Los dos primeros experimentos fueron diseñados para evaluar la potencial variabilidad en la actividad de PON-1 del PS entre verracos, eyaculados dentro de un mismo verraco, y entre las diferentes



fracciones del eyaculado. Para ello la actividad de PON-1 fue evaluada en muestras de PS de eyaculados completos (60 eyaculados [4 por verraco]) y de 3 fracciones del eyaculado (los primeros 10 ml de la FR, el resto de la FR y la post-FR) de 20 eyaculados (uno por verraco). Los resultados mostraron que la actividad de PON-1 en el PS variaba entre verracos ( $P < 0,001$ ) y, en menor medida, entre eyaculados dentro de un mismo verraco ( $P < 0,05$ ). Los resultados también demostraron diferencias en la actividad de PON-1 del PS entre las fracciones del eyaculado ( $P < 0,001$ ); mostrando el PS procedente de los primeros 10 ml de FR y la post-FR el más alto y más bajo nivel de actividad de la enzima, respectivamente. En el tercer experimento se evaluó la relación entre la actividad de PON-1 en el PS con parámetros de calidad y funcionalidad espermática. Un total de 83 eyaculados (uno por verraco) fueron diluidos ( $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y conservados a 15-17 °C, evaluando la calidad (motilidad total, motilidad progresiva y viabilidad espermática) y funcionalidad espermática (producción intracelular de  $H_2O_2$ ) a las 0 y 72 h de conservación. La actividad de PON-1 fue determinada en una muestra de PS de cada uno de los eyaculados. Los resultados evidenciaron que la actividad de PON-1 en el PS estaba positiva y negativamente correlacionada ( $P < 0,01$ ) con la motilidad progresiva y con la producción intra-celular de  $H_2O_2$ , respectivamente, a las 72 h de conservación. El cuarto experimento evaluó la relación entre la actividad de PON-1 en el PS con parámetros de fertilidad (en términos de tasa de partos y tamaño de la camada). Para este estudio se utilizaron un total de 6 verracos incluidos en programas de IA, registrando sus resultados reproductivos a lo largo de un periodo de 6 meses y con un número de cerdas inseminadas por verraco que osciló entre 107 y 189. La actividad de PON-1 fue evaluada en el PS de 18 eyaculados (3 por verraco), recogidos durante el mismo periodo de evaluación. Los verracos fueron clasificados en 3 categorías en función de la tasa parto y tamaño de camada. La actividad de PON-1 fue mayor ( $P < 0,01$ ) en el PS procedente de verracos con alta tasa de parto ( $> 85\%$ ) en comparación con aquellos verracos con una tasa de parto media (85-80 %) o baja ( $< 80\%$ ). Sin embargo, no hubo diferencias en la actividad de PON-1 del PS entre los verracos clasificados en función del tamaño de camada.

El **cuarto artículo (PLoS One 2016, 11:e0162958)** cumple con el **tercer objetivo** propuesto, evaluando la concentración de la enzima GPX5 en el PS porcino. Este estudio se divide en 4 experimentos. El primer experimento evaluó las potenciales diferencias cuantitativas en la concentración de GPX5 del PS entre verracos, eyaculados dentro de un mismo verraco y entre diferentes fracciones del eyaculado. Para ello, la concentración de GPX5 fue determinada en PS de eyaculados completos (44 eyaculados [4 por verraco]) y de 3 fracciones del eyaculado (los primeros 10 ml de la FR, el resto de la FR y la post-FR) de 15 eyaculados (uno por verraco). Los

resultados mostraron que la concentración de GPX5 del PS variaba entre verracos ( $P < 0,001$ ) y, en menor grado, entre eyaculados dentro de un mismo verraco ( $P < 0,001$ ). La concentración de GPX5 del PS también difirió entre las fracciones del eyaculado ( $P < 0,005$ ), mostrando el PS procedente de los primeros 10 ml de FR una menor concentración con respecto al PS del resto de la FR y post-FR. En el segundo experimento se evaluó la expresión de GPX5 en los órganos genitales del verraco. Para ello, se utilizaron muestras de testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias (próstata, glándulas bulbouretrales y vesículas seminales) de 6 verracos incluidos en programas de IA (sacrificados por razones de reemplazo genético), las cuales fueron conservadas en nitrógeno líquido (WB) o fijadas en formalina tamponada al 4%, embebidas en bloques de parafina, seccionadas y montadas en un portaobjetos (análisis inmunohistoquímico). El WB y estudio inmunohistoquímico revelaron la presencia de la GPX5 en todos los órganos genitales, sin diferencias entre verracos. En el tercer experimento se evaluó la relación entre la concentración de GPX5 del PS con parámetros de calidad espermática (motilidad total, motilidad progresiva y viabilidad espermática). Para ello, un total de 44 eyaculados (4 por verraco) fueron diluidos ( $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y conservados a 15-17 °C, evaluando su calidad espermática a las 24 y 72 h. Una muestra de PS de cada uno de los eyaculados fue usada para determinar la concentración de GPX5. Los eyaculados fueron clasificados en dos grupos ( $P < 0,001$ ), con alta o baja concentración de GPX5 en su PS. La motilidad total difirió entre ambos grupos a las 24 h ( $P < 0,01$ ) y a las 72 h ( $P < 0,001$ ) de conservación a 17 °C, mostrando los eyaculados clasificados con alta concentración de GPX5 en su PS un mayor porcentaje de espermatozoides móviles. El último experimento evaluó la relación entre concentración de GPX5 del PS con parámetros de fertilidad (en términos de tasa de parto y tamaño de la camada). Para ello se utilizaron un total de 11 verracos y se registraron sus resultados reproductivos a lo largo de un año, con un número de cerdas inseminadas por verraco que osciló entre 174 y 904. Durante este periodo, la concentración de GPX5 fue evaluada en el PS de 4 eyaculados de cada uno de los verracos (un eyaculado cada 3 meses). Los verracos fueron clasificados en dos grupos ( $P < 0,001$ ): con alta o baja concentración de GPX5 en su PS. Los resultados evidenciaron que la concentración de GPX5 del PS estaba relacionada con parámetros de fertilidad, mostrando los verracos con eyaculados con alta concentración de GPX5 en su PS mayores tasas de partos ( $P < 0,01$ ) y tamaño de camada ( $P < 0,01$ ). Con respecto a la capacidad de la concentración de GPX5 de PS para predecir si un verraco exhibirá buenos resultados reproductivos, la curva COR reveló que la GPX5 tenía un buen valor predictivo discriminatorio tanto para la tasa parto (área bajo la curva [ABC] = 0,75;  $P < 0,01$ ) como para el tamaño de camada (ABC = 0,70;  $P < 0,05$ ).

El **quinto artículo (Journal of Animal Science 2017, 95:1660–1668)** cubre el **cuarto objetivo**, evaluando las propiedades antioxidantes de la MLT en el PS porcino. Este estudio comprende 4 experimentos. En el primer experimento se evaluó la posible estacionalidad en la concentración de MLT en muestras de PS de 48 eyaculados [8 por verraco] recogidos a lo largo de un año (2 eyaculados por cada estación y verraco). La estación de obtención del eyaculado ( $P < 0,01$ ), y consecuentemente el fotoperiodo ( $P < 0,001$ ), influenciaron la concentración de MLT en el PS, mostrando los eyaculados obtenidos durante el fotoperiodo creciente (invierno y primavera) las menores concentraciones de MLT en el PS. En el segundo experimento se evaluaron las potenciales diferencias cuantitativas en la concentración de MLT del PS entre verracos, entre eyaculados dentro de un mismo verraco y entre diferentes fracciones del eyaculado. Para ello, la concentración de MLT fue determinada en muestras de PS procedentes de eyaculados completos, recogidos durante el fotoperiodo creciente (40 eyaculados [4 por verraco]) y decreciente (44 eyaculados [4 por verraco]), y en 3 fracciones del eyaculado (primeros 10 ml de la FR, el resto de la FR y la post-FR) de 15 eyaculados (3 por verraco), recogidos durante el fotoperiodo creciente. La concentración de MLT del PS varió entre verracos ( $P < 0,001$ ) y, en menor grado, entre eyaculados dentro de un mismo verraco ( $P < 0,001$ ). A su vez, esta variabilidad intra-verraco fue menor durante el fotoperiodo creciente en comparación con el fotoperiodo decreciente (verano y otoño). La concentración de MLT del PS también difirió entre las fracciones del eyaculado ( $P < 0,001$ ), mostrando, la mayoría de los verracos, las menores y mayores concentraciones en muestras de PS procedentes de los primeros 10 ml de la FR y la post-FR, respectivamente. En el tercer experimento se evaluó la relación entre la concentración de MLT en el PS con parámetros de calidad y funcionalidad espermática. Un total de 30 eyaculados (uno por verraco) fueron diluidos ( $30 \times 10^6$  espermatozoides/ml) y conservados a 15-17 °C, evaluando la calidad (motilidad total, motilidad progresiva y viabilidad espermática) y funcionalidad espermática (producción intracelular de  $H_2O_2$ , peroxidación lipídica, producción mitocondrial de  $O_2^-$  y producción total de  $O_2^-$ ) a las 24, 72 y 144 h de conservación. Una muestra de PS de cada uno de los eyaculados fue usada para la cuantificación de la concentración de MLT. Los eyaculados fueron clasificados en 2 grupos ( $P < 0,001$ ): con alta o baja concentración de MLT en su PS. Los parámetros de calidad y funcionalidad espermática evaluados no difirieron entre ambos grupos, a excepción de la producción mitocondrial de  $O_2^-$ , la cual fue menor ( $P < 0,001$ ) en los eyaculados incluidos en el grupo con alta concentración de MLT en su PS. El cuarto experimento evaluó la relación entre concentración de MLT del PS con parámetros de fertilidad (en términos de tasa de parto y tamaño de la camada). Para ello se utilizaron un total de 14 verracos y se registraron sus resultados reproductivos a lo largo de 6 meses (fotoperiodo decreciente), con un número de cerdas inseminadas por verraco

que osciló entre 104 y 814. Durante este periodo, la concentración de MLT fue evaluada en el PS de 3 eyaculados de cada uno de los verracos. Los verracos fueron clasificados en 2 grupos en función de la tasa de parto (alto [84,4-90,4%] o bajo [76,8-81,7%]) y en otros 2 grupos en función del tamaño de la camada (grande [14,7-16,2 lechones/camada] o pequeño [12,5-13,8 lechones/camada]). La concentración de MLT en el PS no difirió entre grupos, demostrando que la concentración de la misma en el PS porcino no estaba relacionada con parámetros de fertilidad.

Las **conclusiones** alcanzadas de los resultados obtenidos en cada uno los estudios se enumeran a continuación:

- |                 |   |
|-----------------|---|
| CONCLUSIÓN<br>1 | La capacidad antioxidante total del plasma seminal, así como la actividad y/o concentración de algunos de sus componentes con propiedades antioxidantes (paraoxonasa tipo 1, glutatión peroxidasa 5 y melatonina), difieren entre verracos, entre eyaculados dentro del verraco y entre las fracciones del eyaculado.   |
| CONCLUSIÓN<br>2 | Todos los órganos del tracto genital del verraco (testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias) son capaces de expresar la enzima glutatión peroxidasa 5.   |
| CONCLUSIÓN<br>3 | La actividad de la paraoxonasa tipo 1 y las concentraciones de colesterol en el plasma seminal de porcino están positivamente correlacionadas.  |
| CONCLUSIÓN<br>4 | La concentración de melatonina en el plasma seminal porcino tiene un patrón estacional, mostrando las menores concentraciones los eyaculados recogidos durante el fotoperiodo creciente (invierno y primavera).   |
| CONCLUSIÓN<br>5 | La capacidad antioxidante total, la actividad de paraoxonasa tipo 1 y las concentraciones de glutatión peroxidasa 5 y la melatonina del plasma seminal porcino están positivamente relacionadas con parámetros de calidad y/o funcionalidad espermática de muestras seminales conservadas a 15-17 °C, y congeladas-descongeladas para el caso de la capacidad antioxidante total. |
| CONCLUSIÓN<br>6 | La capacidad antioxidante total, la actividad de la paraoxonasa tipo 1 y la concentración de glutatión peroxidasa 5 del plasma seminal porcino están positivamente relacionadas con parámetros de fertilidad (tasa de parto y/o tamaño de camada), pudiendo ser consideradas como <b>potenciales biomarcadores de fertilidad</b> .  |



**SUMMARY** The main objective of this PhD Thesis was to **determine components with antioxidant properties in porcine seminal plasma (SP) and to evaluate its predictive value for sperm quality and functionality and for the fertility of boars used in artificial insemination (AI)-programs.**

To achieve this purpose the following particular objectives were set-up to:

OBJECTIVE  
**1** | Analyse the total antioxidant capacity (**TAC**) of boar SP and its relationship with sperm quality and functionality and fertility parameters of ejaculates from boars included in AI-programs (**Paper 1**).

OBJECTIVE  
**2** | Identify and characterize the presence of the enzyme paraoxonase-1 (**PON-1**) in boar SP and to evaluate the relationship among SP-PON-1 activity with sperm quality and functionality and fertility parameters of ejaculates from boars included in AI-programs (**Papers 2 and 3**).

OBJECTIVE  
**3** | Determine the importance of the enzyme glutathione peroxidase 5 (**GPX5**) in boar SP, identifying its expression sites in genital organs and evaluating the relationship among its SP concentration with sperm quality and fertility parameters of ejaculates from boars included in AI-programs (**Paper 4**).

OBJECTIVE  
**4** | Examine the concentration of melatonin (**MLT**) in boar SP and its possible seasonal variation, as well as to evaluate its relationship with sperm quality and functionality and fertility parameters of ejaculates from boars included in AI-programs (**Paper 5**).

The **materials and methods** used to develop the experiments are as follows:

### **Reagents and media**

Unless stated otherwise, all chemicals used in the experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The media were prepared under sterile conditions in a laminar flow chamber (MicroH, Telstar, Terrasa, Spain) using high-purity deionized water (Mili-Q 18 MΩ cm; Millipore Co., Billerica, MA, USA). Before using, the pH (GLP-22, Crison, Barcelona, Spain) and osmolarity (VAPRO, WESCOR, mod 30M Plus Advanced Instruments Inc.; MA, USA) of each media were assessed.

### **Animals and samples**

All procedures were performed according to international guidelines (Directive 2010-63-EU) and approved by the Bioethics Committee of Murcia University (research code: 639/2012).

Ejaculates, luminal fluid of the epididymal cauda and genital tissues (testis, epididymides, accessory sexual glands) were obtained from healthy, sexually mature boars (*aged* 1.5 to 3 yr) of different breeds and crossbred undergoing regular semen collection for commercial AI purposes (AIM Iberica [Topigs Norsvin España, Madrid, Spain]). Boars were housed in individual pens in environmentally controlled (15-25 °C) buildings with windows so that they were exposed to natural daylight and supplementary light for a total of 16 h of light per day. They were provided with *ad libitum* access to water and were fed commercial feedstuff according to nutritional requirements for adult AI-boars. All ejaculates used fulfilled the standards of quantity and sperm quality thresholds for the preparation of semen AI-doses (more than 200 x 10<sup>6</sup> sperm/mL, 70% motile spermatozoa, and 75% of morphologically normal cells).

Inseminated sows were multiparous (parity 1–7), of Landrace and Large White breeds, housed in different commercial farms located in Spain. Sows were cervically inseminated (2-3 times per oestrus) using 24-72 h liquid-stored AI-semen doses (2,500 x 10<sup>6</sup> motile spermatozoa in 80 mL).



## **Seminal plasma processing and storage**

The SP samples were obtained immediately after ejaculate collection through double centrifugation (1,500 xg for 10 min) (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, United Kingdom). The second supernatant was harvested and stored in cryotubes and sent in insulated containers (15-17 °C) to the Andrology Laboratory at the Veterinary Teaching Hospital of the University of Murcia. At the laboratory (2-4 h after SP harvesting), the SP samples were stored at -80 °C (Ultra Low Freezer, Haier Inc., Qingdao, China). For analyses, the SP samples were thawed at room temperature.

## **Assessment of sperm quality and functionality**

Sperm motility was evaluated using a computer-assisted sperm analyser (**CASA**). All other sperm quality and functionality parameters were performed by flow cytometry using a BD FACS Canto II flow cytometer (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

**Sperm motility** was objectively evaluated using an ISASV1®CASA (Proiser R+D, Paterna, Spain) (**Papers 1, 3-5**). The variables recorded were the overall percentage of motile spermatozoa (average path velocity  $\geq 20$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) and the proportion of motile spermatozoa showing rapid and progressive movement (straight line velocity  $\geq 40$   $\mu\text{m}/\text{sec}$ ).

**Sperm viability**, expressed as the percentage of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membrane (**Papers 1, 3-5**), was assessed using a triple fluorescent procedure, which include propidium iodide (**PI**, Molecular Probes, Europe BV, Leiden, The Netherlands), fluorescein-conjugated peanut agglutinin (**PNA-FITC**) and Hoechst 33342 (**H-42**). Viable spermatozoa were those exhibiting intact plasma and acrosome membranes (H-42 positive, PI negative and PNA-FITC negative) and were reported as percentages.

**Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation** was measured in viable spermatozoa using the fluorochromes 5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (**CM-H<sub>2</sub>DCFDA**, Molecular Probes), PI and H-42, following the procedure described by Guthrie and Welch (2006) (**Papers 1, 3 and 5**). Data were reported as the percentage of viable spermatozoa (H-42 positive and PI negative) that produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>DCFDA-positive).

**Lipid peroxidation** was assessed in viable spermatozoa using the fluorochromes C<sub>11</sub> BODIPY<sup>581/591</sup> (**BODIPY**, Molecular Probes), H-42 and PI, following a modified procedure described by Silva and Gadella (2006) (**Papers 1 and 5**). Data were reported as arbitrary fluorescence units per 10<sup>3</sup> viable spermatozoa (H-42 positive and PI negative) (**Paper 1**) or as percentage of viable BODIPY-positive spermatozoa (**Paper 5**).

**Mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> production** was assessed in viable spermatozoa using the fluorochromes MitoSOX Red (**MSR**, Molecular Probes), H-42 and SYTOX Green (Molecular Probes), following a modified Koppers *et al.* (2008) procedure (**Paper 5**). Data were reported as percentage of viable (H-42 positive and SYTOX Green negative) MSR-positive spermatozoa.

**Total sperm O<sub>2</sub><sup>-</sup> production** was assessed in viable spermatozoa using the fluorochromes dihydroethidium (**DHE**, Molecular Probes), H-42 and SYTOX Green, following a modified of Koppers *et al.* (2008) procedure (**Paper 5**). Data were reported as the percentage of viable (H-42 positive and SYTOX Green negative) DHE-positive spermatozoa.

### **Sperm cryopreservation (Paper 1)**

The semen samples were centrifuged (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau, Germany) at 17 °C for 3 min at 2,400 xg, and the sperm pellets were frozen using the straw freezing procedure described by Alkmin *et al.* (2014). Briefly, sperm pellets were extended in freezing extender (**FE**) to a concentration of 1.5 x 10<sup>9</sup> sperm/mL. After cooling to 5 °C for 150 min, the sperm were re-extended with FE-glycerol-Equex extender to a final concentration of 1.0 x 10<sup>9</sup> sperm/mL. The sperm were thereafter packed into 0.5 mL polyvinyl chloride French straws (Minitüb, Tiefenbach, Germany) and were stored in liquid nitrogen before thawing, which was performed in a circulating water bath at 37 °C for 20 s.

### **Measurement of TAC (Paper 1)**

The TAC was determined in SP samples via an automated measurement method developed by Erel (2004). The method is based on 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) decolourization by antioxidants according to their concentration and antioxidant capacity. The colour change is measured as a change in light absorbance at 660 nm. For the process, an automated analyser (AU400, Olympus, Minneapolis, USA) was used, and the assay was calibrated

with 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (**Trolox**). The TAC value of each SP sample was expressed as an equivalent of the mM-concentration of Trolox solution per liter.

### **Measurement of PON-1 activity (Papers 2 and 3)**

The PON-1 enzymatic activity was assessed in SP samples, measuring the hydrolysis of p-nitrophenyl acetate to p-nitrophenol in an automated analyzer (Olympus AU400) adapting a previously described assay (Tvariionaviciute *et al.*, 2012) for SP. The p-nitrophenyl acetate is the recommended substrate for measuring PON-1 enzymatic activity in body fluids (Ceron *et al.* 2014). The samples were treated before analysis with acetazolamide (0.5 mM) and di-isopropyl fluorophosphates (0.5 mM) to ensure that there were no contaminating enzymes other than PON-1 capable of hydrolysing p-nitrophenyl acetate. This assay had intra- and inter-assay coefficient variations < 10%, high linearity under serial dilutions and a limit of detection of 0.01 IU/mL. PON-1 activity was expressed as IU/mL.

### **Measurement of PON-1 concentration (Paper 2)**

PON-1 concentration was determined in SP samples using a commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (**ELISA**) following manufacturer's instructions (Aviscera bioscience Inc. Santa Clara, CA, USA). This assay employs a pre-coated microplate with monoclonal antibodies specific for PON-1. Briefly, standards and SP samples were pipetted into the wells, followed by the addition of a detection antibody and anti-Rabbit IgG-horseradish peroxidase. Finally, the substrate solution (tetramethylbenzidine, **TBM**) was added and the colour developed in direct proportion to the amount of PON-1 was measured spectrophotometrically at 450/540 nm using a micro-plate reader (Sunrise, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). The results were expressed as ng/mL.

### **Measurement of total cholesterol concentration (Paper 2)**

Total cholesterol presence in SP samples was quantified using an automated clinical chemistry analyser (Olympus AU2700) following the manufacturer's instructions (CHOLESTEROL OSR6116, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). In this procedure, cholesterol esters are hydrolysed by cholesterol esterase. The free cholesterol produced is oxidised by cholesterol oxidase to

cholestene-3-one with the simultaneous production of hydrogen peroxide, which oxidatively couples with 4-aminoantipyrine and phenol in the presence of peroxidase to yield a chromophore. The red quinoneimine dye formed was measured spectrophotometrically at 540/600 nm as an increase in absorbance. The results were expressed as mg/mL.

#### **Measurement of GPX5 concentration (Paper 4)**

The GPX5 concentration was measured in SP samples using a commercially available ELISA following the manufacturer's instructions (Mybiosource, San Diego, California, USA). This assay employs a pre-coated microplate with monoclonal antibodies specific for pig GPX5. Briefly, standards and SP samples were pipetted into the wells to bind GPX5 to the immobilized antibodies. Then, a biotin-conjugated antibody specific for GPX5 was added followed by inclusion of streptavidin-conjugated horseradish peroxidase. Finally, a substrate solution was added and colour developed in proportion to the amount of bound GPX5. The colour change was measured at 450/590 nm using a micro-plate reader (PowerWave XS; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). The results were expressed as ng/mL.

#### **Measurement of MLT concentration (Paper 5)**

The MLT concentration was measured in SP samples using a commercially available ELISA (Direct saliva melatonin ELISA kit, Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) following manufacturer instructions. This assay employs a pre-coated microplate with antibodies specific for MLT. Briefly, standards and SP samples were pipetted into the wells to bind MLT to the immobilized antibodies. Then, a biotinylated MLT was added to the wells, followed by streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. Finally, a substrate solution (TBM) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added and the absorbance was measured on a microtiter plate reader (TECAN Spectrafluor plus, Männedorf, Switzerland) at 450 nm. The results were expressed as pg/mL.

#### **Immunohistochemical examination (Paper 4)**

The sections of tissue samples were deparaffinized and incubated with a primary polyclonal antibody against GPX5 (ab190733, Abcam, Cambridge, United Kingdom).

Thereafter, sections were incubated with a polyclonal goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with biotin (Dako, Stockholm, Sweden). The immunostaining was developed using the VECTASTAIN Elite ABC kit and ImmPACT DAB peroxidase substrate (Vector Labs, Burlingame, USA). The immunostained slides were visualized using an upright Olympus BX51 light microscope, equipped with phase contrast optics and a XC30 camera, and the CellSens Olympus imaging software (Olympus). The immunostaining at slide level was ranked by 3 independent observers for determine eventual changes in distribution or subjective intensity among the boars explored. A simple ranking system (0: no staining, +++++ various degrees of immune stating intensity) was used.

### **Western blotting (WB) (Paper 4)**

Proteins were extracted from tissue samples in RIPA buffer. After centrifugation, the supernatant was processed for protein quantification, diluted to a final known concentration and loaded into a gel. A polyclonal anti-GPX-5 (ab190733, Abcam) was used as primary antibody. A conventional WB analysis was done using a modified protocol described by Vicente-Carrillo *et al.* (2016).

### **Fertility records**

Fertility outcomes, as farrowing rates (number of farrowing sows respect to the number of inseminated sows), litter size (total number of piglets born per litter) and fertility index (number of piglets born per 100 sows inseminated) were recorded over 6 (**Paper 3 and 5**) and 12 (**Paper 1 and 4**) month-period. More than 100 sows were inseminated by each of the boars included.

### **Statistical analysis**

Data were analysed using IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Spain, Madrid). Residual data for each statistical variable were evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test to check the assumption of normality, and data that were not normally distributed were arcsine- (data in percents) or log- (count data) transformed. For the analysis of most data, one-way, two-way or mixed model ANOVAs were used. The Bonferroni test was used for post-hoc analyses where

appropriate. The intra-class correlation coefficient was used to display the extent of intra-boar variability. The hierarchical cluster analysis was performed to identify naturally occurring groups. The Pearson parametric correlation test was used to measure the relationship among variables. Finally, non-parametric receiver operating characteristic (**ROC**) curve was used to determine the value of the GPX5 concentration in SP samples to discriminate between boars showing high or low fertility outcomes

The **experimental designs and results** of each of the papers that comprise this PhD Thesis are detailed below:

The **first paper (Scientific Reports 2015, 5:18538)** met the **first objective**, evaluating boar SP-TAC. This study comprised 3 experiments. The objective of the first experiment was to identify potential differences in SP-TAC among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate. TAC was assessed in SP samples from entire ejaculates (60 ejaculates [4 per boar]) and from 3 different ejaculate portions (the first 10 mL of sperm rich fraction [SRF], the rest of SRF and the post-SRF) of 43 ejaculates (one per boar). The results showed that SP-TAC differed among boars ( $P < 0.001$ ) and, to a lesser degree, among ejaculates within each boar ( $P < 0.001$ ). In addition, SP-TAC also differed among ejaculate portions ( $P < 0.001$ ), showing the first 10 mL of SRF and the post-SRF the highest and the lowest SP-TAC values, respectively. The second experiment aimed to evaluate the putative influence of SP-TAC on the ability of boar sperm to tolerate preservation, either when stored as liquid-extended semen (experiment 2a) or following freezing and thawing (experiment 2b). In experiment 2a, a total of 90 ejaculates (one per boar) were extended ( $30 \times 10^6$  sperm/mL) and stored at 15-17 °C. Sperm quality (total and progressive motility and viability) and functionality (intracellular  $H_2O_2$  generation and lipid peroxidation) parameters were evaluated at 24 and 72 h of storage. A SP sample of each ejaculate was used for TAC measurement. The ejaculates were classified into 3 groups as with high, moderate or low SP-TAC ( $P < 0.001$ ). The sperm quality and functionality parameters did not differ among SP-TAC groups, neither at 24 nor at 72 h of storage. However, the relative decline (difference in percentage between the 2 storage times) in sperm quality was larger ( $P < 0.05$ ) in semen samples from ejaculates with low SP-TAC than those with high SP-TAC. In experiment 2b, a total of 14 ejaculates (2 per boar) were cryopreserved in 3 separate portions: the first 10 mL of SRF, the rest of SRF and a proportion mix of the first 10 mL of SRF, the rest of SRF and the post-SRF to simulate the entire ejaculate (mainly derived from post-SRF), following the protocol described by Alkmin *et al.* (2014). The TAC was measured in SP samples from each portion and entire ejaculate. Sperm quality and functionality parameters (described in experiment 2a) were evaluated at 30 and 150 min post-thawing. Post-thaw total- and progressive sperm motility and viability were similar in the first 10 mL of SRF and the rest of SRF yet higher ( $P < 0.01$ ) than in the entire ejaculate (mainly post-SRF), irrespective of post-thaw evaluation time. Intracellular  $H_2O_2$  generation and lipid peroxidation in thawed viable spermatozoa were higher ( $P < 0.01$ ) in the entire

ejaculate (mainly post-SRF) than in the first 10 mL of SRF or rest of SRF. Finally, the third experiment evaluated the potential relationship between SP-TAC and fertility parameters (in terms of farrowing rate, litter size and fertility index). A total of 18 AI-boars were used in the experiment and their fertility outcomes were recorded over a 12-month period. The number of inseminated sows per boar ranged between 107 and 801. The SP-TAC values were measured in 3 ejaculates per boar (one ejaculate every 4 months). The SP-TAC values were positively correlated with litter size ( $r = 0.54$ ,  $P < 0.05$ ) and fertility index ( $r = 0.52$ ,  $P < 0.05$ ). The 18 boars were classified into 2 groups as having high or low SP-TAC values ( $P < 0.001$ ). Boars with high SP-TAC values showed averaged higher fertility outcomes than those with low SP-TAC values, as evidenced in farrowing rates ( $P < 0.05$ ), litter sizes ( $P < 0.01$ ) and fertility index ( $P < 0.01$ ).

The **second paper (Molecular Reproduction & Development 2015, 82: 58-65)** develops partially the **second objective**, identifying for the first time the presence of PON enzyme in boar ejaculates. The concentration and activity of PON-1 were measured in 10 SP samples from 10 ejaculates (one per boar). The results demonstrated the presence of PON-1 in boar SP, showing a negative correlation between its concentration and its activity ( $r = -0.76$ ,  $P < 0.01$ ). The SP-PON-1 activity was negatively correlated with ejaculate volume ( $r = -0.72$ ,  $P < 0.05$ ), but positively correlated with sperm concentration ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.05$ ). Since it is known that the association of the enzyme with high-density lipoprotein (**HDL-C**) is a prerequisite for normal PON-1 activity (James & Deakin 2004), in this study the total cholesterol concentration (which include HDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol, very low-density lipoprotein-cholesterol) was measured in the same SP samples. Total SP-cholesterol concentration was negatively correlated with SP-PON-1 concentration ( $r = -0.71$ ,  $P < 0.05$ ) but positively correlated ( $r = 0.77$ ,  $P < 0.01$ ) with SP-PON-1 activity.

The **third paper (Andrology 2015, 3: 315-320)** completed the **second objective**, evaluating SP-PON-1 activity and its relationship with sperm quality and functionality and fertility parameters. For this study 4 separate experiments were carried out. The first two experiments were designed to evaluate the potential variability in SP-PON-1 activity among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate. For this, PON-1 activity was quantified in SP samples from entire ejaculates (60 ejaculates [4 per boar]) and from 3 different ejaculate portions (the first 10 mL of SRF, the rest of SRF and the post-SRF) of 20 ejaculates (one per boar). The results showed that SP-PON-1 activity differed among boars ( $P < 0.001$ ) and, to a lesser degree, among ejaculates within each boar ( $P < 0.05$ ). In addition, SP-PON-1 activity also differed



among ejaculate portions ( $P < 0.001$ ), showing the first 10 mL of SRF and the post-SRF the highest and the lowest PON-1 activity levels, respectively. The third experiment aimed to evaluate the relationship among SP-PON-1 activity with sperm quality and functionality parameters. A total of 83 ejaculates (one per boar) were extended ( $30 \times 10^6$  sperm/mL) and stored at 15-17 °C. Sperm quality (total and progressive motility and viability) and functionality (intracellular  $H_2O_2$  generation) parameters were evaluated at 0 and 72 h of storage. A SP sample of each ejaculate was used for PON-1 activity measurement. SP-PON-1 activity was positive and negatively correlated ( $P < 0.01$ ) with progressive motility and intracellular  $H_2O_2$  generation, respectively, at 72 h of liquid storage. The fourth experiment evaluated the association between SP-PON-1 activity and fertility parameters (in terms of farrowing rate and litter size). A total of 6 AI-boars were used in the experiment and their fertility outcomes were recorded over a 6-month period. The number of inseminated sows per boar ranged between 107 and 189. The SP-PON-1 activity was measured in 18 ejaculates (3 per boar). The 6 boars were classified into 3 categories according to farrowing rates and litter size. Ejaculates from boars with high farrowing rate ( $> 85\%$ ) showed higher activity of SP-PON-1 ( $P < 0.01$ ) than those from boars with medium (85–80%) or low ( $< 80\%$ ) farrowing rate. However, SP-PON-1 activity did not differ among the 3 litter size categories.

The **fourth paper (PLoS One 2016, 11: e0162958)** met the **third objective**, assessing the GPX5 concentration in boar SP. This study comprised 4 experiments. The first experiment aimed to identify potential differences in SP-GPX5 concentration among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate. GPX5 concentration was quantified in SP samples from entire ejaculates (44 ejaculates [4 per boar]) and from 3 different ejaculate portions (the first 10 mL of SRF, the rest of SRF and the post-SRF) of 15 ejaculates (one per boar). The results showed that SP-GPX5 concentration differed among boars ( $P < 0.001$ ) and, to a lesser degree, among ejaculates within each boar ( $P < 0.001$ ). In addition, SP-GPX5 concentration varied significantly ( $P < 0.005$ ) among ejaculate portions, the first 10 mL of SRF showed lower concentrations than the rest of SRF and the post-SRF. In the second experiment, the expression sites of GPX5 in boar genital organs were evaluated. For this, tissue samples from testis, epididymis and accessory sex glands (prostate, bulbourethral glands and seminal vesicles) of 6 AI-boars (slaughtered for genetic replacement) were stored in liquid nitrogen (WB) or fixed in 4% buffered formalin, embedded in paraffin blocks, sliced and mounted on slides (immunohistochemical analysis). The WB and immunohistochemical analysis revealed the presence of GPX5 in all genital organs, without differences among boars. The third experiment aimed to evaluate the relationship between SP-GPX5 concentration and sperm quality parameters.

A total of 44 ejaculates (4 per boar) were extended ( $30 \times 10^6$  sperm/mL) and stored at 15-17 °C. Sperm quality (total and progressive motility and viability) was evaluated at 24 and 72 h of storage. A SP sample of each ejaculate was used for GPX5 concentration measurement. The ejaculates were classified into 2 groups ( $P < 0.001$ ) as with high or low SP-GPX5 concentrations. The total motility differed among SP-GPX5 groups at 24 h ( $P < 0.01$ ) and at 72 h of storage ( $P < 0.001$ ), showing the semen samples from ejaculates with high SP-GPX5 concentrations the highest percentage of total motile sperm. The last experiment evaluated the association between SP-GPX5 concentration and fertility parameters (in terms of farrowing rate and litter size). A total of 11 Al-boars were used in the experiment, recording their fertility outcomes over a 12-month period. The number of inseminated sows per boar ranged between 174 and 904. The SP-GPX5 concentration was measured in 4 ejaculates per boar (one ejaculate every 3 months). The 11 boars were classified into 2 groups ( $P < 0.001$ ) as having high or low SP-GPX5 concentrations. The SP-GPX5 concentration influenced fertility outcomes, showing overall highest farrowing rates ( $P < 0.01$ ) and litter sizes ( $P < 0.01$ ) the boars with high SP-GPX5 concentrations. Regarding the ability of the SP-GPX5 concentrations to predict whether a boar will exhibit high fertility outcomes, the ROC curve revealed that the SP-GPX5 concentrations had a fair discriminatory value for both farrowing rate (area under the ROC curve [AUC] = 0.75,  $P < 0.01$ ) and litter size (AUC = 0.70,  $P < 0.05$ ).

The **fifth paper (Journal of Animal Science 2017, 95: 1660-1668)** covered the **fourth objective**, evaluating the putative antioxidant properties of MLT in boar SP. This study comprised 4 experiments. In the first experiment, the potential seasonal variation of SP-MLT concentration was evaluated. A total of 48 ejaculates [8 per boar] were collected during the seasons of the year (2 ejaculates per boar per season) over 1 yr. The season of ejaculate collection ( $P < 0.01$ ) and consequently, the day length period ( $P < 0.001$ ) influenced the SP-MLT concentration, demonstrating that the ejaculates collected during the increasing day length period (winter and spring) exhibited the lowest SP-MLT concentration. The second experiment was designed to evaluate the potential variability in SP-MLT concentration among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate. The MLT concentration was quantified in SP samples from entire ejaculates collected during the increasing (40 ejaculates [4 per boar]) and decreasing (44 ejaculates [4 per boar]) day length period and from 3 different ejaculate portions (the first 10 mL of SRF, the rest of SRF and the post-SRF) of 15 ejaculates (3 per boar), collected during the increasing day length period. The results showed that SP-MLT concentration differed among boars ( $P < 0.001$ ) and, to a lesser degree, among ejaculates within each boar ( $P < 0.001$ ). The intra-boar

variability was reduced during the increasing compared with the decreasing day length period (autumn and summer). The SP-MLT concentration also varied ( $P < 0.001$ ) among ejaculate portions, most boars showing a similar pattern of variation that was characterized by the lowest and the highest MLT concentrations in the SP samples from the first 10 mL of SRF and the post-SRF, respectively. The third experiment aimed to evaluate the relationship among SP-MLT concentration with sperm quality and functionality parameters. A total of 30 ejaculates (one per boar) were extended ( $30 \times 10^6$  sperm/mL) and stored at 15-17 °C. Sperm quality (total and progressive motility and viability) and functionality (intracellular  $H_2O_2$  generation, lipid peroxidation, mitochondrial  $O_2^-$  production and total sperm  $O_2^-$  production) parameters were evaluated at 24, 72 and 144 h of storage. A SP sample of each ejaculate was used for MLT concentration measurement. The ejaculates were classified into 2 groups ( $P < 0.001$ ): high or low SP-MLT concentration. Sperm quality and functionality parameters did not differ between the 2 SP-MLT groups at any storage time, with exception of mitochondrial  $O_2^-$  production (positive to MSR), which was lower ( $P < 0.001$ ) in the viable sperm of the semen samples from ejaculates with high SP-MLT concentration. The last experiment evaluated the association between SP-MLT concentration and fertility parameters (in terms of farrowing rate and litter size). A total of 14 AI-boars were used in the experiment, recording their fertility outcomes over a 6-month period (decreasing day length period). The number of inseminated sows per boar ranged between 104 and 814. The SP-MLT concentration was measured in 3 ejaculates per boar. The boars were classified ( $P < 0.001$ ) into 2 groups as having high (84.4 to 90.4%) or low (76.7 to 81.7%) percentages of farrowing rates. No differences in SP-MLT were identified between both boar groups. The 14 boars were also classified ( $P < 0.001$ ) into 2 groups with large (14.7 to 16.2 piglets born per litter) or small (12.5 to 13.8 piglets born per litter) litter sizes. The SP-MLT concentration did not differ between both boar groups.

The **conclusions** of this PhD Thesis are:

- CONCLUSION 1 | The total antioxidant capacity of seminal plasma, as well as the activity and/or concentration of some of its components with antioxidant properties (paraoxonase type 1, glutathione peroxidase 5 and melatonin) differ among boars, ejaculates within boar and among ejaculate portions within an ejaculate.
- CONCLUSION 2 | All boar genital organs (testis, epididymis and accessory sex glands) are able to express the enzyme glutathione peroxidase 5.
- CONCLUSION 3 | The activity of paraoxonase type 1 and the concentrations of total cholesterol in boar seminal plasma are positively correlated.
- CONCLUSION 4 | Melatonin concentration in boar seminal plasma exhibits a seasonal pattern, showing the ejaculates collected during the increasing day length period of year (winter and spring) the lowest concentrations.
- CONCLUSION 5 | The total antioxidant capacity, the activity of paraoxonase type 1 and the concentrations of glutathione peroxidase 5 and melatonin of boar seminal plasma are positively related to sperm quality and/or sperm functionality of semen samples stored at 15-17 °C, and of frozen-thawed semen in the case of total antioxidant capacity.
- CONCLUSION 6 | The total antioxidant capacity, the activity of paraoxonase type 1 and the concentration of glutathione peroxidase 5 in boar seminal plasma are positively related with fertility parameters (in terms of farrowing rate and/or litter size) and could be considered as **potential fertility biomarkers**.

# **REFERENCIAS**

## **REFERENCES**





Alkmin DV, Parrilla I, Tarantini T, Del Olmo D, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J (2016). Seminal plasma affects sperm sex sorting in boars. *Reprod Fertil Dev.* 28: 556-564.

Alkmin DV, Pérez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Vázquez JM, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J (2014). Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology.* 69: 203-210.

Althouse GC (2007). Artificial Insemination in Swine: Boar Stud Management. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* 2nd Edition. 731-738.

Barrabes S, Gary BG, Bouvier BP (2008). Collectis® automated boar collection technology. *Theriogenology.* 70: 1368-1373.

Bathgate R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality (2011). *Reprod Domest Anim.* 46: 23-5.

Bonnefont-Rousselot D, Collin F (2010). Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology.* 278: 55-67.

Brezezińska-Slebodzińska E, Slebodziński AB, Pietras B, Wieczorek G (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res.* 47:69-74.

Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella BM (2011). Field data analysis of boar semen quality. *Reprod Domest Anim.* 46: 59-63.

Bromfield JJ (2016). A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction.* 152: 223-232.

Brouwers JF, Silva PF, Gadella BM (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology.* 63: 458-469

Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM (2012). Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Domest Anim.* 47: 12-21.

Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonavičute A (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research.* 10:74.

Dziekońska A, Fraser L, Kozirowska-Gilun M, Strzezek J, Kozirowski M, Kordan W (2014). Seasonal-dependent variations in metabolic status of spermatozoa and antioxidant enzyme activity in the reproductive tract fluids of wild boar/domestic pig hybrids. *Pol J Vet Sci.* 17: 307-313.

Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 37: 277-285.

Flowers WL (2009). Selection for boar fertility and semen quality--the way ahead. *Soc Reprod Fertil.* 66: 67-78.

Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M (2014). In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta.* 1840: 931-934.

Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology.* 83: 399-407.

González-Arto M, Vicente-Carrillo A, Martínez-Pastor F, Fernández-Alegre E, Roca J, Miro J, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Pérez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA, Casao A (2016). Melatonin receptors MT1 and MT2 are expressed in spermatozoa from several seasonal and nonseasonal breeder species. *Theriogenology.* S0093-691X: 30274-6.

Guthrie HD, Welch GR (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 84: 2089-2100.

Karaaslan C, Suzen S (2015). Antioxidant properties of melatonin and its potential action in diseases. *Curr Top Med Chem.* 15: 894-903.

Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 3199-3207.

Mann T, Lutwak-Mann C (1981). *Male Reproductive Function and Semen.* First edition. New York, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Novak S, Ruiz-Sánchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK (2010). Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *J. Androl.* 31:188-200.



Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 78: 85-98.

Pérez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Valero ML, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J (2016). Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. *J Proteomics.* 142: 15-23.

Radomil L, Pettitt MJ, Merkies KM, Hickey KD, Buhr MM (2011). Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. *Reprod Domest Anim.* 46: 39-44.

Roca J, Broekhuijse ML, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Bolarin A (2015). Boar Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized? *Reprod Domest Anim.* 50: 48-55.

Roca J, Parrilla I, Bolarin A, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H (2016). Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology.* 86: 187-193.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA (2005). Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl.* 26: 15-24.

Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play? *Am J Reprod Immunol.* 66: 11-22.

Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martinez EA, Roca J, Vazquez J, Calvete JJ (2009). The physiological roles of the boar ejaculate. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 66:1-21.

Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FJ, Roca J, Rodríguez-Martínez H (2009). Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology.* 71: 662-675.

Silva PF, Gadella M (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 65: 958-978.

Strzezek J, Lapkiewicz S, Lecewicz M (1999). A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim Sci Pap Rep.* 17: 181-188.

Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L (2005). Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol.* 5: 279-290.

Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology.* 52: 447-459.

Tvarijonavičiute A, Tecles F, Caldin M, Tasca S, Cerón J (2012). Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *Am J Vet Res.* 73: 34-41.

Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV (2001). Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 22: 382-394.

Verit FF, Verit A, Ciftci H, Erel O, Celik H (2009). Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. *Journal of Andrology.* 30: 183-189.

Vicente-Carrillo A, Álvarez-Rodríguez M, Rodríguez-Martínez H (2016). The mu ( $\mu$ ) and delta ( $\delta$ ) opioid receptors modulate boar sperm motility. *Mol Reprod Dev.* 83: 724-34.

Zakošek Pipan M, Mrkun J, Kosec M, Nemeč Svete A, Zrimšek P (2014). Superoxide dismutase: a predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. *Biomed Res Int.*:105280.

Žura Žaja I, Samardžija M, Vince S, Vilić M, Majić-Balić I, Đuričić D, Milinković-Tur S (2016). Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. *Anim Reprod Sci.* 170:75-82.

**ARTÍCULOS**

**PAPERS**



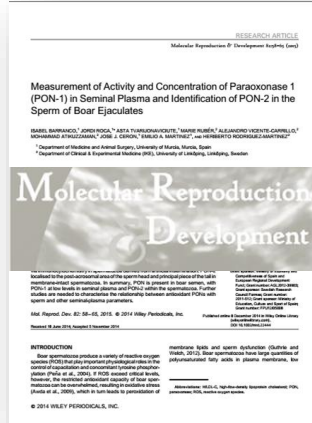


1



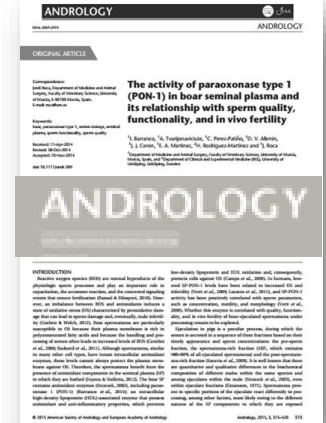
Scientific Reports 2015,  
5:18538

2

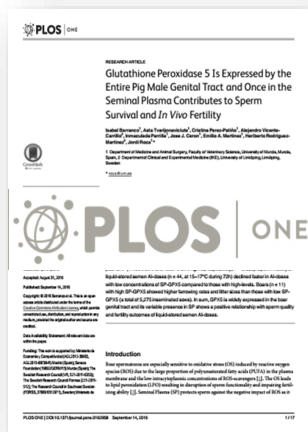


Molecular Reproduction  
& Development 2015,  
82:58-65

3



Andrology 2015,  
3:315-320



PLoS One 2016,  
11:e0162958



Journal of Animal  
Science 2017,  
95:1660-1668

4

5



**ARTÍCULO 1**

**PAPER 1**





# Artículo 1 *Paper 1*

Journal Scientific Reports

## Abstract

The study attempted to clarify the role of total antioxidant capacity of seminal plasma (SP-TAC) on boar sperm survival and fertility after artificial insemination (AI). SP-TAC differed ( $P < 0.001$ ) among boars ( $n^{\circ} = 15$ ) and, to a lesser degree, among ejaculates within male (4 ejaculates/boar). SP-TAC also differed ( $P < 0.001$ ) among ejaculate fractions (43 ejaculates and 3 fractions per ejaculate), of which the sperm-peak portion of the sperm rich ejaculate fraction (SRF) had the highest SP-TAC. SP-TAC was not correlated with sperm quality (motility and viability) or functionality (intracellular ROS generation and lipid peroxidation) of liquid AI-semen samples stored at 17 °C for 72 h (90 AI-samples), but the decline in sperm quality was larger ( $P < 0.05$ ) in ejaculates with low, compared with high SP-TAC (hierarchically grouped). The SP-TAC differences among ejaculate portions agree with sperm cryosurvival rates (14 ejaculates from 7 boars), showing sperm from sperm-peak portion better ( $P < 0.01$ ) post-thaw quality and functionality than those from the entire ejaculate (mainly post-SRF). Boars ( $n^{\circ} = 18$ ) with high SP-TAC (hierarchically grouped) had higher ( $P < 0.05$ ) fertility outcomes (5,546 AI-sows) than those with low SP-TAC. Measurement of SP-TAC ought to be a discriminative tool to prognosis fertility in breeding boars.

URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26688188>

# Artículo 1 *Paper 1*

<b>Authors</b>	<b>Barranco I</b> , Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Parrilla I, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J.
<b>Title</b>	High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility.
<b>Journal</b>	Scientific Reports
<b>Publication date</b>	December 2015
<b>Volume and pages</b>	5: 18538
<b>Journal Citation Reports (2015) category</b>	Multidisciplinary Sciences
<b>Impact factor</b>	5,228
<b>Position</b>	7 of 63
<b>Five-year impact factor</b>	5,525
<b>Doi</b>	10.1038/srep18538

**ARTÍCULO 2**

**PAPER 2**



## Artículo 2 *Paper 2*

Journal Molecular Reproduction and Development

### Abstract

This study revealed and characterized the presence of the antioxidant enzymes paraoxonase (PON) type 1 (PON-1, extracellular) and type 2 (PON-2, intracellular) in boar semen. To evaluate PON-1, an entire ejaculate from each of ten boars was collected and the seminal plasma was harvested after double centrifugation (1,500g for 10 min). Seminal plasma was analysed for concentration as well as enzymatic activity of PON-1 and total cholesterol levels. Seminal-plasma PON-1 concentration ranged from 0.961 to 1.670 ng/ml while its enzymatic activity ranged from 0.056 to 0.400 IU/ml, which represent individual variance. Seminal-plasma PON-1 concentration and enzymatic activity were negatively correlated ( $r = -0.763$ ;  $P < 0.01$ ). The activity of seminal-plasma PON-1 negatively correlated with ejaculate volume ( $r = -0.726$ ,  $P < 0.05$ ), but positively correlated with sperm concentration ( $r = 0.654$ ,  $P < 0.05$ ). Total seminal-plasma cholesterol concentration positively correlated with PON-1 activity ( $r = 0.773$ ;  $P < 0.01$ ), but negatively correlated with PON-1 concentration ( $r = -0.709$ ;  $P < 0.05$ ). The presence of intracellular PON-2 was determined via immunocytochemistry in spermatozoa derived from artificial insemination. PON-2 localised to the post-acrosomal area of the sperm head and principal piece of the tail in membrane-intact spermatozoa. In summary, PON is present in boar semen, with PON-1 at low levels in seminal plasma and PON-2 within the spermatozoa. Further studies are needed to characterize the relationship between antioxidant PONs with sperm and other seminal-plasma parameters.

URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487823>

## Artículo 2 *Paper 2*

---

<b>Authors</b>	<b>Barranco I</b> , Roca J, Tvarijonaviciute A, Rubér M, Vicente-Carrillo A, Atikuzzaman M, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H
<b>Title</b>	Measurement of activity and concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates
<b>Journal</b>	Molecular Reproduction and Development
<b>Publication date</b>	December 2014
<b>Volume and pages</b>	82:58-65
<b>Journal Citation Reports (2015) category</b>	Reproductive Biology
<b>Impact factor</b>	2,141
<b>Position</b>	16 of 29
<b>Five-year impact factor</b>	2,543
<b>Doi</b>	10.1002/mrd.22444

**ARTÍCULO 3**  
**PAPER 3**





## Artículo 3 *Paper 3*

Journal Andrology

### Abstract

Paraoxonase 1 (PON-1) is a hydrolytic enzyme present in body fluids, capable of protecting cells against oxidative stress. The hypothesis was hereby to test that PON-1, present in seminal plasma (SP), acts protecting boar spermatozoa when showing a reasonable high activity in the ejaculate. SP-PON-1 activity differed ( $p < 0.001$ ) among boars (from 0.10 to 0.29 IU/mL). Intra-boar variability was also observed ( $p < 0.05$ ), but only in two of the 15 boars. SP-PON-1 activity differed among ejaculate portions, showing the spermatozoa-peak portion of spermatozoa-rich ejaculate fraction the highest levels ( $0.35 \pm 0.03$  IU/mL, ranging from 0.12 to 0.69) and the post-sperm ejaculate fraction the lowest levels ( $0.12 \pm 0.01$  IU/mL, ranging from 0.03 to 0.21). SP-PON-1 activity was positively correlated with the percentage of spermatozoa with rapid and progressive movement ( $p < 0.01$ ) and negatively correlated with the generation of intracellular reactive oxygen species ( $p < 0.01$ ) in semen samples after 72 h of liquid storage. SP-PON-1 activity was highest ( $p < 0.01$ ) in boars with highest farrowing rates. In conclusion, SP-PON-1 activity differed among boars and ejaculate fractions/portions. SP-PON-1 activity was positively correlated with sperm quality and functionality of liquid-stored semen samples and it evidenced a positive association with in vivo fertility.

URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25598515>

## Artículo 3 *Paper 3*

<b>Authors</b>	<b>Barranco I</b> , Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Alkmin DV, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J
<b>Title</b>	The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility
<b>Journal</b>	Andrology
<b>Publication date</b>	January 2015
<b>Volume and pages</b>	3:315-320
<b>Journal Citation Reports (2015) category</b>	Andrology
<b>Impact factor</b>	2,515
<b>Position</b>	2 of 5
<b>Five-year impact factor</b>	2,515
<b>Doi</b>	10.1111/andr.309

**ARTÍCULO 4**

**PAPER 4**



## Artículo 4 *Paper 4*

Journal PLoS One

### Abstract

Glutathione peroxidase-5 (GPX5) is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging enzyme identified in boar seminal plasma (SP). This study attempted to clarify its origin and role on sperm survival and fertility after artificial insemination (AI). GPX5 was expressed (Western blot and immunocytochemistry using a rabbit primary polyclonal antibody) in testes, epididymis and accessory sex glands (6 boars). SP-GPX5 concentration differed among boars (11 boars,  $P < 0.001$ ), among ejaculates within boar (44 ejaculates,  $P < 0.001$ ) and among portions within ejaculate (15 ejaculates). The first 10 mL of the sperm rich fraction (SRF, sperm-peak portion) had a significantly lower concentration ( $8.87 \pm 0.78$  ng/mL) than the rest of the SRF and the post-SRF ( $11.66 \pm 0.79$  and  $12.37 \pm 0.79$  ng/mL, respectively,  $P < 0.005$ ). Sperm motility of liquid-stored semen AI-doses ( $n = 44$ , at 15-17°C during 72h) declined faster in AI-doses with low concentrations of SP-GPX5 compared to those with high-levels. Boars ( $n = 11$ ) with high SP-GPX5 showed higher farrowing rates and litter sizes than those with low SP-GPX5 (a total of 5,275 inseminated sows). In sum, GPX5 is widely expressed in the boar genital tract and its variable presence in SP shows a positive relationship with sperm quality and fertility outcomes of liquid-stored semen AI-doses.

URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27627110>

## Artículo 4 *Paper 4*

<b>Authors</b>	<b>Barranco I</b> , Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Vicente-Carrillo A, Parrilla I, Cerón JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J
<b>Title</b>	Glutathione peroxidase 5 is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and in vivo fertility
<b>Journal</b>	PLoS One
<b>Publication date</b>	September 2016
<b>Volume and pages</b>	11:e0162958
<b>Journal Citation Reports (2016) category</b>	Multidisciplinary Sciences
<b>Impact factor</b>	2,806
<b>Position</b>	15 of 64
<b>Five-year impact factor</b>	3,394
<b>Doi</b>	10.1371/journal.pone.0162958

**ARTÍCULO 5**

**PAPER 5**





# Artículo 5 *Paper 5*

Journal Journal of Animal Science

## Abstract

Melatonin (MLT) is present in seminal plasma (SP) of mammalian species, including pigs, and it is credited with antioxidant properties. This study aims to identify the sources of variation and the role of boar SP MLT on sperm quality and functionality and *in vivo* fertilizing ability of liquid-stored semen doses used in AI programs. The SP MLT was measured using an ELISA kit in a total of 219 ejaculates collected from 76 boars, and reproductive records of 5,318 AI sows were recorded. Sperm quality was assessed according to motility (computer-aided sperm analysis) and viability (cytometry evaluation). Sperm functionality was assessed according to the cytometric determination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, total and mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, and lipid peroxidation in liquid AI semen samples stored at 17°C over 144 h. The concentration of SP MLT differed among seasons ( $P < 0.01$ ) and day length periods ( $P < 0.001$ ) of the year, demonstrating that the ejaculates collected during the increasing day length period ( $9.80 \pm 1.38$  pg/mL, range: 2.75-21.94) had lower SP MLT concentrations than those collected during the decreasing day length period ( $16.32 \pm 1.67$  pg/mL, range: 5.02-35.61). The SP MLT also differed ( $P < 0.001$ ) among boars, among ejaculates within boar, and among portions within the ejaculate, demonstrating that SP from the first 10 mL of sperm-rich ejaculate fraction (SRF) exhibited lower MLT concentrations than post-SRF. The SP MLT was negatively related ( $P < 0.001$ ) to mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in viable sperm. The SP MLT did not differ among AI boars ( $n = 14$ ) hierarchically grouped according to high and low fertility outcomes. In conclusion, SP MLT concentration in AI boars varies depending on the season of ejaculate collection and differs among boars, ejaculates within boar, and portions within ejaculate. The SP MLT may act at the mitochondrial level of sperm by reducing the generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. However, this antioxidant role of SP MLT was not reflected in sperm quality or *in vivo* fertility outcomes of AI semen doses.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28464088>

## Artículo 5 *Paper 5*

---

<b>Authors</b>	<b>Barranco I</b> , Casao A, Pérez-Patiño C, Parrilla I, Muiño-Blanco T, Martínez EA, Cebrian-Perez JA, Roca J
<b>Title</b>	Profile and reproductive roles of seminal plasma melatonin of boar ejaculates used in artificial insemination programs
<b>Journal</b>	Journal of Animal Science
<b>Publication date</b>	February 2017
<b>Volume and pages</b>	95:1660-1668
<b>Journal Citation Reports (2016) category</b>	Agriculture, Dairy & Animal Science
<b>Impact factor</b>	1,863
<b>Position</b>	8 of 58
<b>Five-year impact factor</b>	2,160
<b>Doi</b>	10.2527/jas2016.1286

**ABREVIATURAS**  
**ABBREVIATIONS**





## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>BODIPY</b>	C <sub>11</sub> BODIPY <sup>581/591</sup>
<b>CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	5-(y-6) clorometil-2',7' diacetato diclorodihidrofluoresceína de éster de acetilo
<b>COR</b>	Característica operativa del receptor
<b>DHE</b>	Dihidroetidio
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FR</b>	Fracción Rica
<b>GPX5</b>	Glutación peroxidasa 5
<b>H-42</b>	Hoechst 33342
<b>HDL-C</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>IA</b>	Inseminación Artificial
<b>IP</b>	Ioduro de Propidio
<b>MC</b>	Medio de congelación
<b>MLT</b>	Melatonina
<b>MSR</b>	MitoSOX Red
<b>PNA-FITC</b>	Fluoresceína con aglutinina de maní
<b>PON-1</b>	Paraoxonasa tipo 1
<b>PS</b>	Plasma Seminal
<b>TAC</b>	Capacidad antioxidante total
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>WB</b>	Western Blot



## ABBREVIATIONS

<b>AI</b>	Artificial insemination
<b>AUC</b>	Area under the curve
<b>BODIPY</b>	C <sub>11</sub> BODIPY <sup>581/591</sup>
<b>CASA</b>	Computer-assisted sperm analyser
<b>CM-H<sub>2</sub>DCFDA</b>	5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
<b>DHE</b>	Dihydroethidium
<b>ELISA</b>	Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FE</b>	Freezing extender
<b>GPX5</b>	Glutathione peroxidase 5
<b>H-42</b>	Hoechst 33342
<b>HDL-C</b>	High-density lipoprotein cholesterol
<b>MLT</b>	Melatonin
<b>MSR</b>	MitoSOX Red
<b>PI</b>	Propidium iodide
<b>PNA-FITC</b>	Fluorescein-conjugated peanut agglutinin
<b>PON-1</b>	Paraoxonase type 1
<b>ROC</b>	Receiver operating characteristic curve
<b>SP</b>	Seminal plasma
<b>SRF</b>	Sperm rich fraction
<b>TAC</b>	Total antioxidant capacity
<b>TBM</b>	Tetramethylbenzidine
<b>Trolox</b>	6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
<b>WB</b>	Western Blot





**APÉNDICE GRÁFICO**

**GRAPHIC APPENDIX**



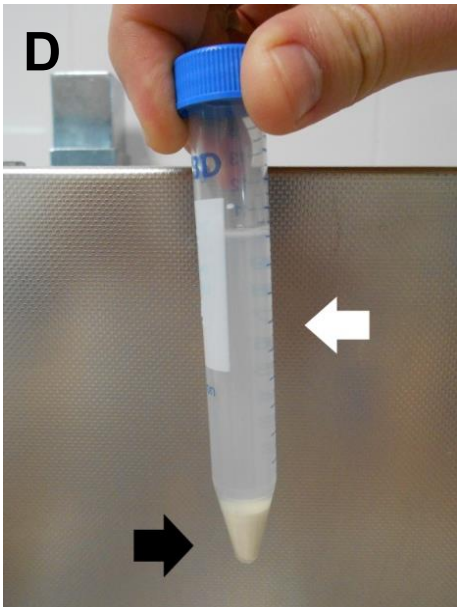
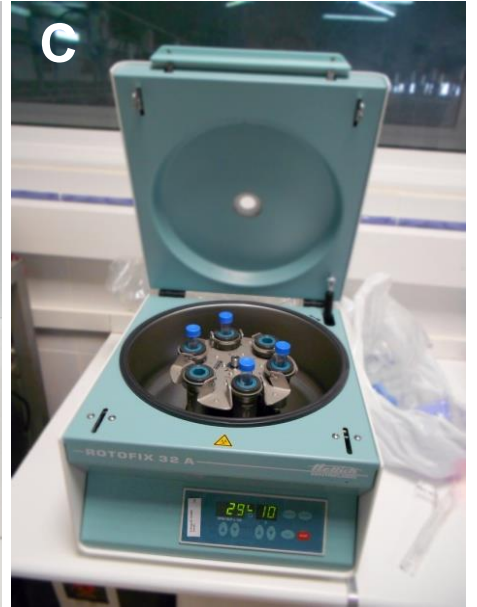
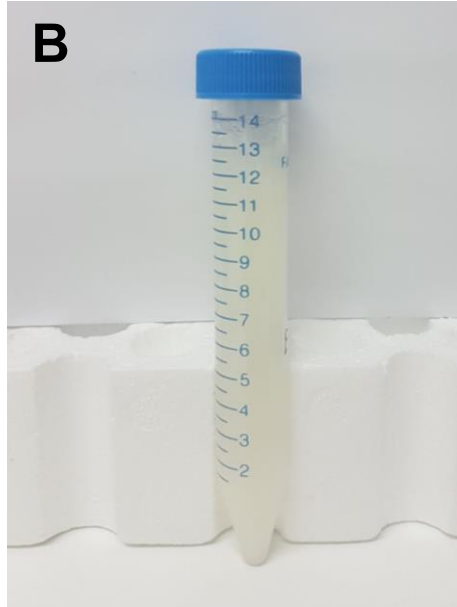
**Figura 1. Recolección del eyaculado.** **A-B**, exterior (A) e interior (B) del centro de inseminación artificial ubicado en Calasparra (Murcia) perteneciente a la empresa AIM Ibérica (Topigs Norsvin España, Madrid, España); **C-D**, recolección manual del eyaculado mediante el método de la mano enguantada; **E-F**, recolección del eyaculado mediante un método semi-automático (Collectis®)

**Figure 1. Ejaculate collection.** **A-B**, outside (A) and inside (B) of the artificial insemination center located in Calasparra (Murcia) belonging to AIM Ibérica (Topigs Norsvin España, Madrid, Spain); **C-D**, manual ejaculate collection by the gloved hand method; **E-F**, ejaculate collection by a semi-automatic method (Collectis®)



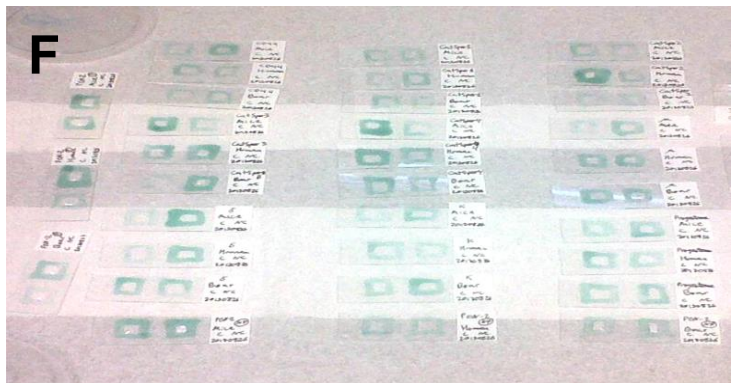
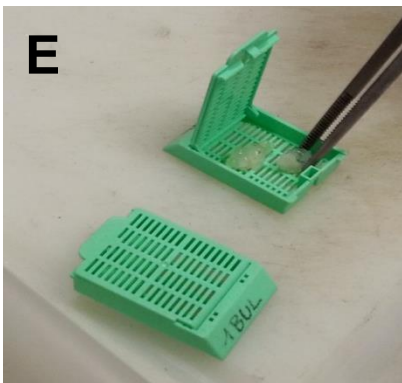
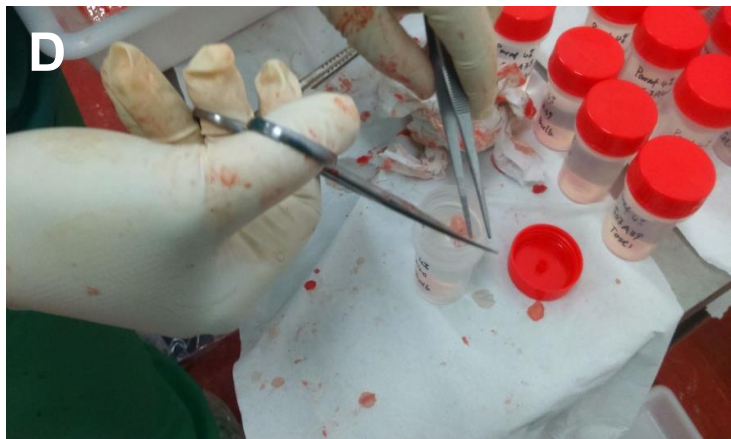
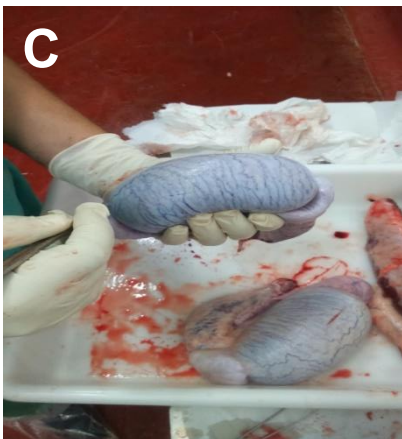
**Figure 2. Obtención y almacenamiento del plasma seminal.** **A**, recolección del eyaculado; **B**, muestras de semen en un tubo de 15 ml para centrifugado posterior; **C**, centrifuga; **D**, pellet de espermatozoides (flecha negra) y plasma seminal (flecha blanca); **E**, criotubo con plasma seminal; **F**, Congelador de -80°C.

**Figure 2. Harvest and storage of seminal plasma.** **A**, ejaculate collection; **B**, semen sample into 15mL-centrifuge tube; **C**, centrifuge; **D**, sperm pellet (black arrow) and seminal plasma (white arrow), **E**, cryotube with seminal plasma; **F**, -80 °C Freezer.



**Figure 3. Procedimiento de técnicas inmunohistoquímicas.** **A**, cuerpo del verraco en la cadena de eviscerado del matadero; **B**, órganos genitales del verraco; **C**, secciones del tejido; **D**, muestras de tejidos fijadas en formalina tamponada al 4%; **E**, muestras de tejidos embebidas en bloques de parafina; **F**, incubación de las muestras con el anticuerpo primario.

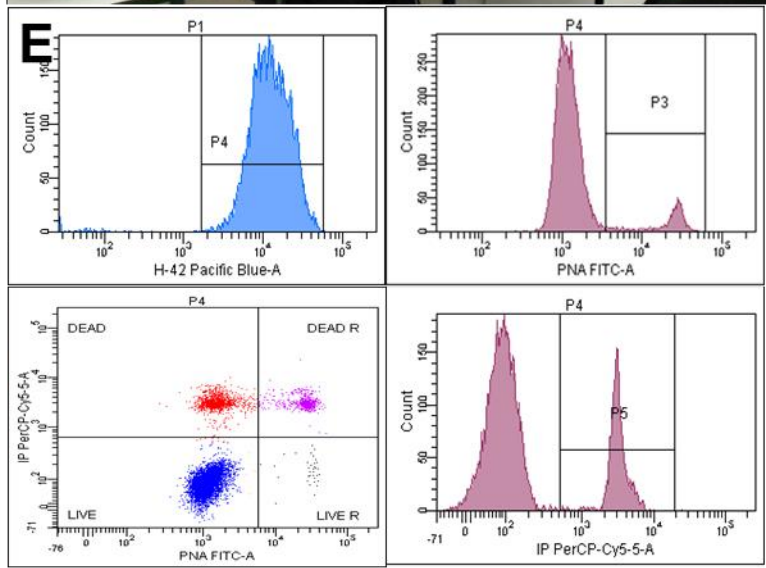
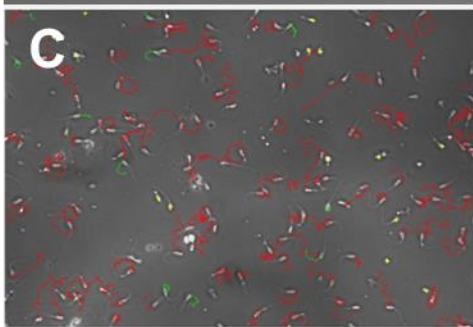
**Figure 3. Immunohistochemical procedures.** **A**, boar body in slaughterhouse; **B**, boar genital organs; **C**, tissue sections; **D**, tissue samples fixed in 4% buffered formalin; **E**, tissue samples embedded in paraffin blocks; **F**, Incubation of samples with a primary antibody.



**Figure 4. Análisis de la calidad y funcionalidad espermáticas.** **A**, sistema de análisis espermático computarizado; **B**, cámara de Makler; **C**, secuencia de trayectorias de los espermatozoides móviles; **D**, citómetro de flujo (BD FACS Canto II, Becton Dickinson & Company) **E**, histograma obtenido del citómetro de flujo de muestras de espermatozoides teñidas con Hoechst 33342 (H-42), yoduro de propidio (IP), y fluoresceína con aglutinina de maní (FITC-PNA) (evaluación de la viabilidad espermática). P4 representa todos los eventos positivos a H-42, P5 representa los espermatozoides positivos a IP y P3 representa los espermatozoides positivos a FITC-PNA.

**Figure 4. Assessment of sperm quality and function.** **A**, computer-assisted sperm analyser; **B**, Makler chamber; **C**, track sequences of motile spermatozoa; **D**, flow cytometer (BD FACS Canto II, Becton Dickinson & Company); **E**, flow cytometric histogram in semen samples stained with Hoechst 33342 (H-42), propidium iodide (PI), and fluorescein-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (for sperm viability). The P4 population represents all events stained with H-42, P5 represents PI-positive sperm population and P3 represent FITC-PNA positive sperm population.





**Figura 5. Analizador automatizado** (AU400, Olympus) usado para evaluar la capacidad antioxidante total, la actividad enzimática de la paraoxonasa tipo 1 y la concentración de colesterol en muestras de plasma seminal de verraco.

**Figure 5. Automated analyser** (AU400, Olympus), used to evaluate the total antioxidant capacity, enzymatic activity of paraoxonase type 1 and cholesterol concentration in boar seminal plasma samples.



