Biologia de la reproducció
Vol. 17, p. 63-69 (2022)

RELACIÓ DELS ANTIOXIDANTS NO ENZIMÀTICS I DE L'ÍNDEX D'ESTRÉS OXIDATIU DEL PLASMA SEMINAL AMB LA CRIOTOLERÀNCIA DELS ESPERMATOZOIDES DE RUC

Jaime Catalán [1,2,*], Iván Yánez-Ortiz [1,2], Iris Martínez-Rodero [1], Asta Tvarijonaviciute [3], Marc Yeste [2,4] Jordi Miró [1], and Isabel Barranco [5]

[1] Servei de Reproducció Equina, Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Espanya.
[2] Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana (TechnoSperm), Institut de Tecnologia Alimentària i Agrària (INTEA), Universitat de Girona, Girona, Espanya.
[3] Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Facultat de Veterinària, Universitat de Múrcia, Múrcia, Espanya.
[4] Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Espanya.
[5] Departament de Ciències Mèdiques Veterinàries, Universitat de Bolonya, Ozzano dell'Emilia, Bolonya, Itàlia.
*Autor corresponent: dr.jcatalan@gmail.com

Resum

Aquest estudi va investigar si els antioxidants no enzimàtics (mesurats en termes de concentració total de tiols, capacitat antioxidant reductora cúprica (CUPRAC), capacitat reductora fèrrica del plasma (FRAP), capacitat antioxidant equivalent de Trolox (TEAC)) i l'índex d'estrès oxidatiu (OSI)) del plasma seminal (SP) de ruc estan relacionats amb la criotolerància dels seus espermatozoides. Amb aquest objectiu, es van recol·lectar 15 ejaculacions de diferents rucs i es van dividir en dues alíquotes. En la primera es va avaluar l'activitat dels antioxidants no enzimàtics i el SP-OSI, mentre que la segona es va criopreservar. Abans de la congelació, es van avaluar la motilitat i la viabilitat espermàtiques. Després de la descongelació, es van determinar la motilitat i la integritat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides mitjançant citometria de flux. En funció dels percentatges de motilitat total (TM) i espermatozoides amb la membrana plasmàtica intacta a la descongelació, les mostres es van classificar com a ejaculacions amb "bona" (GFE) o "mala" congelabilitat (PFE) a través d'una anàlisi de conglomerats. Els nivells d'activitat de CUPRAC, FRAP i TEAC van ser majors ($p < 0,05$) en les GFE que en les PFE, mentre que el SP-OSI va ser major ($p < 0,05$) en les PFE que en les GFE. Per tant, es pot concloure que els antioxidants no enzimàtics i l'OSI del PS de ruc estan relacionats amb la criotolerància espermàtica, i que les els antioxidants CUPRAC, FRAP, TEAC i SP-OSI es podrien utilitzar com a marcadors de la criotolerància dels espermatozoides d'aquesta espècie.

Abstract

This study investigated whether non-enzymatic antioxidants (measured in terms of total thiol, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), ferric plasma reducing capacity (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)) and oxidative stress index (OSI)) of donkey seminal plasma (SP) are related to sperm cryotolerance. For this purpose, 15 ejaculates were collected from different donkeys and divided into two aliquots. One aliquot was used to evaluate the activity of non-enzymatic antioxidants and SP-OSI, whereas the other was cryopreserved. Before cryopreservation, sperm motility and viability were assessed. After thawing, the motility and integrity of the sperm plasma membrane were evaluated by CASA and flow cytometry. Depending on the percentages of total motility (TM) and sperm with an intact plasma membrane upon thawing, samples were classified as "good" (GFE) or "poor" freezability ejaculates (PFE) through cluster analysis. The activity levels of CUPRAC, FRAP and TEAC were higher ($p < 0.05$) in GFE than in PFE, whereas SP-OSI was higher ($p < 0.05$) in PFE than in GFE. It can, therefore, be concluded that non-enzymatic antioxidants and donkey SP-OSI are related to sperm cryotolerance, and that antioxidants CUPRAC, FRAP, TEAC and SP-OSI could be used as markers of sperm cryotolerance in this species.

INTRODUCCIÓ

La criopreservació del semen redueix la supervivència i la capacitat fecundant dels espermatozoides de mamífers (Yeste *et al.*, 2015). Aquesta reducció es deu a l'impacte de la congelació i la descongelació en la integritat de la membrana plasmàtica, que també afecta a la motilitat i la viabilitat espermàtiques (Watson, 2000). L'exposició dels espermatozoides a un entorn estressant durant la criopreservació s'associa amb una sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (Yeste *et al.*, 2015). Aquesta situació podria causar un desequilibri en el sistema de defensa antioxidant de la cèl·lula i conduir a un estrès oxidatiu (OS) a l'espermatozoide, amb la subsegüent peroxidació lipídica (LPO) de la membrana plasmàtica (Amidi *et al.*, 2016). En el cas dels èquids, els espermatozoides són especialment sensibles a aquests esdeveniments degut a la gran quantitat d'àcids grassos poliinsaturats presents a la seva membrana plasmàtica (Papas *et al.*, 2020). A més, la baixa quantitat d'enzims antioxidants dins de la cèl·lula espermàtica, juntament amb la gran quantitat de mitocondris, fa que els antioxidants (enzimàtics i no enzimàtics) presents al SP siguin la principal defensa contra el dany induït per l'OS (Muiño-Blanco *et al.*, 2008; Papas *et al.*, 2019a). Per aquesta raó, l'eliminació del SP abans de la congelació pot augmentar la susceptibilitat dels espermatozoides a aquest OS (Papas *et al.*, 2020).

En rucs, com en altres espècies de mamífers, s'observa una alta variabilitat interindividual i intraindividual en la capacitat dels espermatozoides de mantenir la seva integritat durant la criopreservació (Neuhauser *et al.*, 2019), fet que porta a la classificació de les ejaculacions com a "bones" (GFE) o "males" congeladores (PFE) (Brinsko *et al.*, 2000; Papas *et al.*, 2019b). Aquestes diferències podrien explicar-se per la variabilitat en la composició del SP entre individus i ejaculacions (Bromfield, 2016). En aquest sentit, un estudi recent del nostre grup va investigar si les activitats de quatre enzims amb propietats antioxidants presents al SP de ruc (superòxid dismutasa, catalasa, glutatió peroxidasa i glutatió reductasa) estaven relacionades amb la resistència dels espermatozoides a la congelació i descongelació (Papas *et al.*, 2020). Fins on sabem, no hi ha informació prèvia sobre si altres components del SP amb propietats antioxidants, més enllà d'aquests enzims, estan relacionats amb la congelabilitat dels espermatozoides de ruc. Una investigació recent en semen de porc va revelar que la capacitat antioxidant no enzimàtica total del SP estava involucrada positivament en la criotolerància dels espermatozoides, minimitzant l'OS produïda per la congelació (Li *et al.*, 2018). El present estudi va tenir com a objectiu determinar si els antioxidants no enzimàtics (mesurats en termes de tiol total, capacitat antioxidant reductora del coure (CUPRAC), capacitat reductora fèrrica del plasma (FRAP) i capacitat antioxidant equivalent de Trolox (TEAC)) i l'índex d'estrès oxidatiu (OSI) del plasma seminal (PS) de ruc estan relacionats amb la criotolerància dels espermatozoides.

MATERIAL I MÈTODES

Animals i mostres de semen. Es van utilitzar un total de 15 ejaculacions procedents de 15 rucs catalans diferents. Després de la recol·lecció, el volum de cada ejaculació es va dividir en dues alíquotes. La primera alíquota es va centrifugar per obtenir les mostres de SP i mesurar els nivells d'activitat d'antioxidants no enzimàtics i l'SP-OSI. L'altra alíquota es va diluir amb diluent de Kenney (1:5; *v:v*) prèviament escalfat (38° C) per avaluar la motilitat (mitjançant anàlisi de semen assistit per ordinador, CASA) i la viabilitat espermàtiques (mitjançant tinció amb eosina-nigrosina) abans de la congelació. Tots les ejaculacions van complir els llindars estàndard de qualitat del semen (> 60% d'espermatozoides vius i > 70% d'espermatozoides morfològicament normals).

Aïllament del plasma seminal. Cada alíquota de semen destinada a l'obtenció del SP es va centrifugar a 1500×g durant 10 min (JP Selecta SA, Barcelona, Espanya) a 4 °C, almenys cinc vegades fins a assegurar l'absència d'espermatozoides. Posteriorment, les alíquotes de SP es van emmagatzemar a -80°C fins a l'anàlisi dels antioxidants.

Mesura dels nivells d'activitat dels antioxidants no enzimàtics i SP-OSI. La capacitat antioxidant no enzimàtica total del SP de ruc es va avaluar en termes de CUPRAC, FRAP i TEAC, seguint els protocols descrits per Li et al. (2018), i el tiol total seguint el procediment descrit per Jocelyn (1987) i Da Costa et al. (2006). Els resultats de TEAC, FRAP i CUPRAC estan expressats en mmol/L i els resultats de tiol

total estan expressats en µmol/L. Per calcular el SP-OSI, l'estat oxidatiu total (TOS) del SP es va mesurar prèviament fent servir el mètode descrit per Erel (2005) adaptat al SP de ruc. Els resultats de TOS estan expressats en µmol H_2O_2 equiv./L. Posteriorment, el valor del SP-OSI es va calcular utilitzant la fórmula següent, segons el que descriu Wu et al. (2017): OSI (unitat arbitrària) = TOS (µmol H_2O_2 equiv./L)/TEAC (mmol Trolox equiv./L).

Tots aquests assaigs es van dur a terme utilitzant un analitzador químic automàtic Olympus AU400 (Olympus GmbH, Hamburg, Alemanya). Tots els analits es van mesurar per duplicat per a cada mostra de SP. En tots els analits, cada prova va mostrar variacions de coeficient intrassaig i interassaig per sota del 10%.

Criopreservació espermàtica. Abans de la criopreservació, el semen diluït es va centrifugar a 600 g durant 15 minuts a 20° C (Medifriger BL-S, JP Selecta SA; Barcelona, Espanya). Seguidament, es va eliminar el sobrenedant i el pèl·let resultant es va resuspendre en un diluent de congelació comercial (Botucrio®, Botupharma Animal Biotechnology; Botucatu, Brasil). Posteriorment, es va revaluar la concentració espermàtica, la motilitat i la integritat de la membrana plasmàtica, i es va afegir el medi de congelació (Botucrio®) fins a assolir una concentració final de 200 × 10^6 espermatozoides viables per mL. Posteriorment, les mostres es van envasar en palletes de 0,5 mL i es van criopreservar amb un congelador de velocitat controlada (Ice-Cube 14S; Minitüb). El protocol de descongelació va consistir a incubar les palles durant 30 s a un bany Maria a 38° C, seguit de la dilució (1:3) de diluent Kenney, també prèviament escalfat a 38° C (concentració final: 50 × 10^6 espermatozoides/mL).

Avaluació de la qualitat espermàtica. Abans i després de la criopreservació, es va avaluar la motilitat espermàtica mitjançant un sistema CASA. Es van comptar un mínim de 1000 espermatozoides per anàlisi. Els percentatges de motilitat total (TM, %) i progressiva (PM, %) es van registrar a cada avaluació. D'altra banda, mitjançant citometria de flux es va avaluar la integritat de la membrana plasmàtica després de la descongelació, utilitzant el *LIVE/DEAD Sperm Viability Kit* (SYBR14, espermatozoides viables i PI, espermatozoides no viables), seguint un protocol modificat per espermatozoides de ruc, adaptat de Garner and Johnson (1995).

Anàlisi estadística. Les anàlisis de dades es van dur a terme amb el paquet estadístic R (V 4.0.3, R Core Team; Viena, Àustria). Es van realitzar les proves de Shapiro-Wilk i Levene per verificar la distribució normal i la homogeneïtat de les variàncies, respectivament. Quan fou necessari, les dades es van transformar utilitzant l'arrel quadrada de l'arcsinus (*arcsin* $\sqrt{x}$) per complir els supòsits paramètrics.

El nivell mínim de significació estadística per a totes les anàlisis es va fixar en $P \leq 0{,}05$. Els resultats es mostren com a mitjana ± error estàndard de la mitjana (SEM). La classificació de les 15 ejaculacions en grups de GFE i PFE es va realitzar mitjançant una anàlisi de conglomerats jeràrquic de lligament complet utilitzant les distàncies euclidianes dels percentatges de TM i espermatozoides viables ($SYBR14^+/PI^-$) obtinguts a cada mostra després de la descongelació, com es descriu a Morató et al. (2018). Els nivells d'activitat d'antioxidants no enzimàtics (tiols totals, CUPRAC, FRAP i TEAC), així com l'SP-OSI entre GFE i PFE, es van comparar mitjançant una prova *t* per a mostres independents. Quan, fins i tot després de ser transformats linealment, aquestes dades no coincidien amb els supòsits paramètrics, es va utilitzar com a alternativa la prova de Mann-Whitney.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Classificació dels ejaculacions de ruc en els grups GFE i PFE després de la descongelació

D'acord amb la TM i la viabilitat dels espermatozoides ($SYBR14^+/PI^-$) obtingudes després de la descongelació, les 15 ejaculacions es van classificar (per agrupament jeràrquic, $P < 0{,}01$) en GFE (n = 8) i PFE (n = 7). Els percentatges de TM i espermatozoides viables ($SYBR14^+/PI^-$) després de la descongelació foren significativament més alts ($P < 0{,}01$ i $P < 0{,}001$, respectivament; Figura 1) en el grup

GFE (48,76 ± 1,58 i 48,85 ± 1,23%, respectivament) comparats amb el grup PFE (32,29 ± 3,17 i 30,43 ± 2,64%, respectivament).

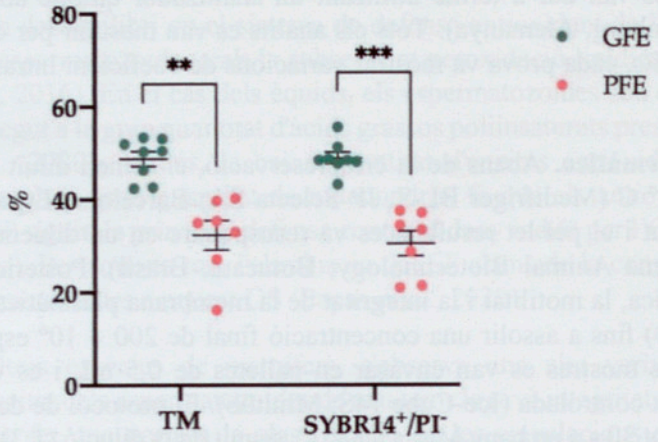

Figura 1. Mitjana ± SEM dels percentatges de espermatozoides amb motilitat total (TM) i membrana plasmàtica intacta ($SYBR14^+/PI^-$) després de la descongelació en ejaculacions de ruc (n = 15) classificades como a bones (GFE) o males congeladores (PFE). Els punts representen els valores individuals de TM i $SYBR14^+/PI^-$ en GFE i PFE. El símbol * indica $P \leq 0{,}05$, ** indica $P \leq 0{,}01$; i *** indica $P \leq 0{,}001$.

Nivells d'activitat d'antioxidants no enzimàtics en el SP de ruc

No es van trobar diferències en els nivells de tiols totals entre els grups GFE i PFE (Figura 2a). Això no obstant, els nivells d'activitat de CUPRAC, FRAP y TEAC en el SP foren majors ($P < 0{,}05$) en les ejaculacions de ruc classificades com a GFE que en les classificades com a PFE (Figura 2b-d). Els valors de CUPRAC foren 1,93 ± 0,15 i 1,37 ± 0,19 mmol/L, respectivament. Els valors de FRAP foren 2,09 ± 0,18 i 1,27 ± 0,25 mmol/L, respectivament. Per la seva part, els valors de TEAC foren 2,59 ± 0,12 y 1,97 ± 0,26 mmol/L, respectivament.

Aquests nivells d'activitat coincideixen amb els observats prèviament en semen de porc en el cas de FRAP i TEAC (Li *et al.*, 2018), que van ser més alts als GFE que als PFE, i difereixen en el cas dels nivells de CUPRAC, que van ser més baixos en els GFE que en els PFE (Li *et al.*, 2018). Aquesta diferència es podria deure a la composició diferent del SP i al distint efecte dels antioxidants segons l'espècie (Papas et al., 2019b), la temporada reproductiva (Waheed *et al.*, 2013; Papas *et al.*, 2019a) i la edat de l'animal (Waheed *et al.*, 2013).

En línia amb aquesta consideració, és raonable suggerir que la resistència dels espermatozoides de ruc a la criopreservació podria estar determinada pels nivells d'activitat dels antioxidants enzimàtics i no enzimàtics totals (mesurats en termes de CUPRAC, FRAP i TEAC) en el SP. El breu contacte dels espermatozoides amb el SP abans de la seva eliminació podria ser suficient perquè els antioxidants exercissin un efecte beneficiós sobre la criotolerància dels espermatozoides de ruc, tal i com s'ha observat en cavalls (Papas *et al.*, 2019b; Papas *et al.*, 2020).

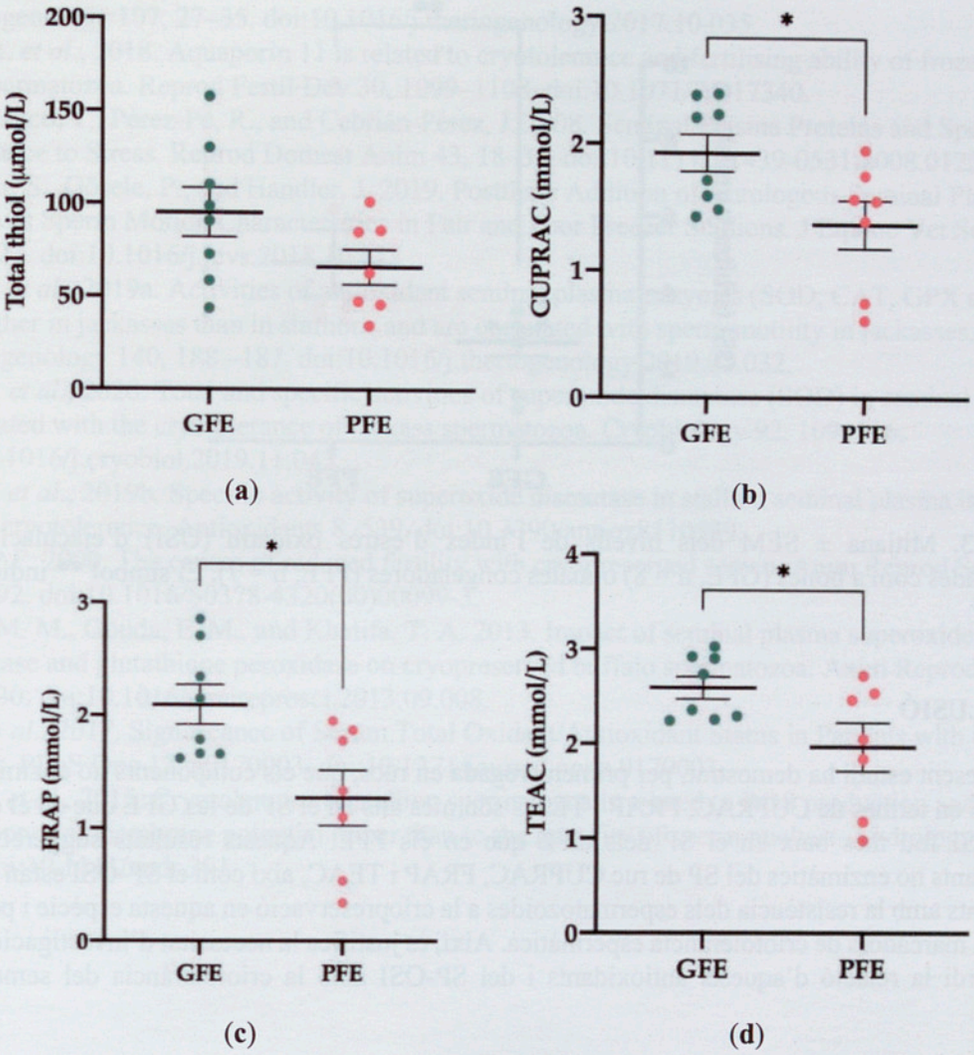

Figura 2. Mitjana ± SEM dels nivells d'activitat dels antioxidants no enzimàtics (tiols totals (a), capacitat antioxidant reductora cúprica (CUPRAC, b), capacitat reductora fèrrica del plasma (FRAP, c) i capacitat antioxidant equivalent de Trolox (TEAC, d)) en el plasma seminal (SP) d'ejaculacions de rucs classificades com a bones (GFE, n = 8) o males congeladores (PFE, n = 7). *$P \leq 0{,}05$.

Nivells d'OSI en el SP de ruc

Els nivells d'OSI en el SP d'ejaculacions de ruc foren significativament més baixos ($p < 0{,}01$) en les GFE que en les PFE (Figura 3). Els valors foren 2,65 ± 0,36 i 4,68 ± 0,87, respectivament. Aquests resultats concorden amb un estudi previ realitzat en porcí, on es va trobar que els nivells de SP-OSI estaven relacionats amb la resistència dels espermatozoides emmagatzemats a 17°C (Barranco *et al.*, 2021). Això indicaria la gran rellevància de l'equilibri entre el sistema de defensa antioxidant cel·lular i els agents oxidants presents en els espermatozoides, i també recolzaria la importància que la determinació de SP-OSI podria tenir en la predicció de la criotolerància del semen de ruc.

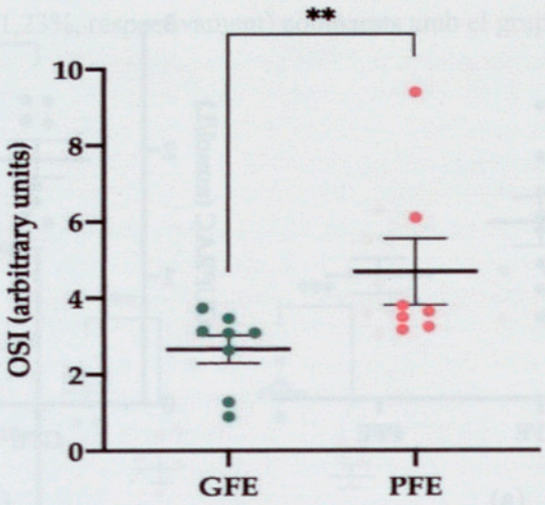

Figura 3. Mitjana ± SEM dels nivells de l'índex d'estrès oxidatiu (OSI) d'ejaculacions de ruc classificades com a bones (GFE, n = 8) o males congeladores (PFE, n = 7). El símbol ** indica $P \leq 0{,}01$.

CONCLUSIÓ

El present estudi ha demostrat, per primera vegada en rucs, que els components no enzimàtics del SP mesurats en termes de CUPRAC, FRAP i TEAC són més alts en el SP de les GFE que en el de les PFE i el SP-OSI fou més baix en el SP dels GFE que en els PFE. Aquests resultats suggereixen que els antioxidants no enzimàtics del SP de ruc CUPRAC, FRAP i TEAC, així com el SP-OSI estan directament relacionats amb la resistència dels espermatozoides a la criopreservació en aquesta espècie i podrien usar-se com a marcadors de criotolerància espermàtica. Així, es justifica la necessitat d'investigació addicional que abordi la relació d'aquests antioxidants i del SP-OSI amb la criotolerància del semen en altres espècies.

BIBLIOGRAFIA

Amidi, F. *et al.*, 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank 174 17, 745–756. doi:10.1007/S10561-016-9566-5.

Barranco, I. *et al.*, 2021. Measurement of Oxidative Stress Index in Seminal Plasma Can Predict In Vivo Fertility of Liquid-Stored Porcine Artificial Insemination Semen Doses. Antioxidants 10, 1203. doi:10.3390/antiox10081203.

Brinsko, S. P., Crockett, E. C., and Squires, E. L. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology 54, 129–136. doi:10.1016/S0093-691X(00)00331-9.

Bromfield, J. J. 2016. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. Reproduction 152, R223–R232. doi:10.1530/REP-16-0313.

Da Costa, C. M., Dos Santos, R. C. C., and Lima, E. S. 2006. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. J Bras Patol Med Lab 42, 345–350. doi:10.1590/S1676-24442006000500006.

Erel, O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin. Biochem. 38, 1103–1111. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.

Garner, D. L., and Johnson, L. A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol Reprod 53, 276–284. doi:10.1095/biolreprod53.2.276.

Jocelyn, P. C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. Methods Enzymol. 143, 44–67. doi:10.1016/0076-6879(87)43013-9.

Li, J. *et al.*, 2018. Seminal plasma antioxidants are directly involved in boar sperm cryotolerance.

Theriogenology 107, 27–35. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.10.035.
Morató, R. *et al.*, 2018. Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising ability of frozen–thawed bull spermatozoa. Reprod Fertil Dev 30, 1099–1108. doi:10.1071/RD17340.
Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., and Cebrián-Pérez, J. 2008. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. Reprod Domest Anim 43, 18–31. doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01228.X.
Neuhauser, S., Gösele, P., and Handler, J. 2019. Postthaw Addition of Autologous Seminal Plasma Improves Sperm Motion Characteristics in Fair and Poor Freezer Stallions. J Equine Vet Sci 72, 117–123. doi:10.1016/j.jevs.2018.10.028.
Papas, M. *et al.*, 2019a. Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. Theriogenology 140, 188 –187. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.08.032.
Papas, M. *et al.*, 2020. Total and specific activities of superoxide dismutase (SOD) in seminal plasma are related with the cryotolerance of jackass spermatozoa. Cryobiology 92, 109–116. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.11.043.
Papas, M. *et al.*, 2019b. Specific activity of superoxide dismutase in stallion seminal plasma is related to sperm cryotolerance. Antioxidants 8, 539. doi:10.3390/antiox8110539.
Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 60–61, 481–492. doi:10.1016/S0378-4320(00)00099-3.
Waheed, M. M., Gouda, E. M., and Khalifa, T. A. 2013. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa. Anim Reprod Sci 142, 126–130. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.09.008.
Wu, R. *et al.*, 2017. Significance of Serum Total Oxidant/Antioxidant Status in Patients with Colorectal Cancer. PLoS One 12, e0170003. doi:10.1371/journal.pone.0170003.
Yeste, M. *et al.*, 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. Andrology 3, 395–407. doi:10.1111/andr.291.